

Учреждение образования
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

В. Н. Леонтьев, О. С. Игнатовец

ХИМИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

**Электронный курс лекций
для студентов специальности 1-48 02 01
«Биотехнология»**

Минск 2013

УДК 577.1(075.8); 615.011.5
ББК 22.239я73; 52.81я73
Л47

Рассмотрен и рекомендован редакционно-издательским советом университета.

Р е ц е н з е н т ы:
заведующий лабораторией НИИ ФХП БГУ
доктор биологических наук, профессор *В. М. Шкуматов*;
заместитель генерального директора по вопросам
инновационного развития РУП «Белмедпрепараты»
кандидат технических наук *Т. В. Трухачева*

Леонтьев, В. Н.

Л47 Химия биологически активных веществ : электронный курс лекций для студентов специальности 1-48 02 01 «Биотехнология» / В. Н. Леонтьев, О. С. Игнатовец. – Минск : БГТУ, 2013. – 151 с.

Электронный курс лекций посвящен структурно-функциональным особенностям и химическим свойствам основных классов биологически активных веществ (белков, углеводов, липидов, витаминов, антибиотиков и др.). Описаны методы химического синтеза и структурного анализа перечисленных классов соединений, их свойства и воздействие на биологические системы, а также распространение в природе.

УДК 577.1(075.8); 615.011.5
ББК 22.239я73; 52.81я73

© УО «Белорусский государственный
технологический университет», 2013
© Леонтьев В. Н., Игнатовец О. С., 2013

ОГЛАВЛЕНИЕ

Тема 1. Введение.....	4
Тема 2. Белки и пептиды. Первичная структура белков и пептидов.....	6
Тема 3. Структурная организация белков и пептидов. Методы выделения	22
Тема 4. Химический синтез и химическая модификация белков и пептидов.....	32
Тема 5. Ферменты	42
Тема 6. Некоторые биологически важные белки	64
Тема 7. Структура нуклеиновых кислот.....	72
Тема 8. Строение углеводов и углеводсодержащих биополи- меров	84
Тема 9. Структура, свойства и химический синтез липидов	99
Тема 10. Стероиды.....	112
Тема 11. Витамины	115
Тема 12. Введение в фармакологию. Фармакокинетика	129
Тема 13. Средства, влияющие на центральную нервную систему.....	135
Тема 14. Сульфаниламидные препараты	137
Тема 15. Антибиотики.....	139
Список литературы.....	150

Тема 1. Введение

Химия биологически активных веществ изучает строение и биологические функции важнейших компонентов живой материи, в первую очередь биополимеров и низкомолекулярных биорегуляторов, уделяя основное внимание выяснению закономерностей взаимосвязи между структурой и биологическим действием. По существу, она является химическим фундаментом современной биологии. Разрабатывая основополагающие проблемы химии живого мира, биоорганическая химия способствует решению задач получения практически важных препаратов для медицины, сельского хозяйства, ряда отраслей промышленности.

Объекты изучения: белки и пептиды, нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды, биополимеры смешанного типа – гликопротеины, нуклеопротеины, липопротеины, гликолипиды и т. п.; алкалоиды, терпеноиды, витамины, антибиотики, гормоны, простагландины, ростовые вещества, феромоны, токсины, а также синтетические лекарственные препараты, пестициды и др.

Методы исследования: основной арсенал составляют методы органической химии, однако для решения структурно-функциональных задач привлекаются и разнообразные физические, физико-химические, математические и биологические методы.

Основные задачи: выделение в индивидуальном состоянии изучаемых соединений с помощью кристаллизации, перегонки, различных видов хроматографии, электрофореза, ультрафильтрации, ультрацентрифугирования, противоточного распределения и т. п.; установление структуры, включая пространственное строение, на основе подходов органической и физико-органической химии с применением масс-спектрометрии, различных видов оптической спектроскопии (ИК, УФ, лазерной и др.), рентгеноструктурного анализа, ядерного магнитного резонанса, электронного парамагнитного резонанса, дисперсии оптического вращения и кругового дихроизма, методов быстрой кинетики и т. п. в сочетании с расчетами на ЭВМ; химический синтез и химическая модификация изучаемых соединений, включая полный синтез, синтез аналогов и производных, – с целью подтверждения структуры, выяснения связи строения и биологической функции, получения практически ценных препаратов; биологическое тестирование полученных соединений *in vitro* и *in vivo*.

Наиболее часто встречающиеся в биомолекулах функциональные группы:

$R-OH$	гидроксильная (спирты)	$R-NH_2$	аминогруппа (амины)
$R-C \begin{smallmatrix} \nearrow O \\ \searrow H \end{smallmatrix}$	альдегидная (аль- дегиды)	$R-C \begin{smallmatrix} \nearrow O \\ \searrow NH_2 \end{smallmatrix}$	амидная (амиды)
$R_1-C \begin{smallmatrix} \nearrow R_2 \\ \parallel O \end{smallmatrix}$	карбонильная (ке- тоны)	$R_1-C \begin{smallmatrix} \nearrow O \\ \searrow O-R_2 \end{smallmatrix}$	сложно- эфирная
$R-C \begin{smallmatrix} \nearrow O \\ \searrow OH \end{smallmatrix}$	карбоксильная (кислоты)	R_1-O-R_2	эфирная
$R-SH$	сульфгидрильная (тиолы)	$R-CH_3$	метильная
$R_1-S-S-R_2$	дисульфидная	$R-CH_2-CH_3$	этильная
$R-O-P \begin{smallmatrix} \uparrow OH \\ \parallel O \end{smallmatrix} OH$	фосфатная	$R-\text{C}_6\text{H}_5$	фенильная
$R-NH-C \begin{smallmatrix} \parallel NH \\ \searrow NH_2 \end{smallmatrix}$	гуанидиновая	$R-\text{Im}$	имидазольная

Тема 2. Белки и пептиды.

Первичная структура белков и пептидов

Белки – высокомолекулярные биополимеры, построенные из остатков аминокислот. Молекулярная масса белков колеблется в пределах от 6000 до 2 000 000 Да. Именно белки являются продуктом генетической информации, передаваемой из поколения в поколение, и осуществляют все процессы жизнедеятельности в клетке. Этим удивительным по разнообразию полимерам присущи одни из наиболее важных и разносторонних клеточных функций.

Белки можно разделить:

1) **по строению**: простые белки состоят из остатков аминокислот и при гидролизе распадаются, соответственно, только на свободные аминокислоты или их производные.

Сложные белки – это двухкомпонентные белки, которые состоят из какого-либо простого белка и небелкового компонента, называемого простетической группой. При гидролизе сложных белков, помимо свободных аминокислот, образуется небелковая часть или продукты ее распада. В их состав могут входить ионы металлов (металлопротеины), молекулы пигментов (хромопротеины), они могут образовывать комплексы с другими молекулами (липо-, нуклео-, гликопротеины), а также ковалентно связывать неорганический фосфат (фосфопротеины);

2) **растворимости в воде**:

- водорастворимые,
- солерастворимые,
- спирторастворимые,
- нерастворимые;

3) **выполняемым функциям**: к биологическим функциям белков относятся:

- каталитическая (ферментативная),
- регуляторная (способность регулировать скорость химических реакций в клетке и уровень метаболизма в целом организме),
- транспортная (транспорт веществ в организме и перенос их через биомембраны),
- структурная (в составе хромосом, цитоскелета, соединительных, мышечных, опорных тканей),

– рецепторная (взаимодействие рецепторных молекул с внеклеточными компонентами и инициирование специфического клеточного ответа).

Кроме этого, белки выполняют защитные, запасные, токсические, сократительные и другие функции;

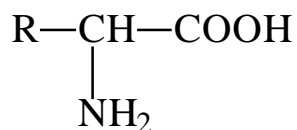
4) *в зависимости от пространственной структуры:*

– фибриллярные (они используются природой как структурный материал),

– глобулярные (ферменты, антитела, некоторые гормоны и др.).

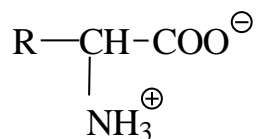
АМИНОКИСЛОТЫ, ИХ СВОЙСТВА

Аминокислотами называются карбоновые кислоты, содержащие аминогруппу и карбоксильную группу. Природные аминокислоты являются 2-аминокарбоновыми кислотами, или α -аминокислотами, хотя существуют такие аминокислоты, как β -аланин, таурин, γ -аминомасляная кислота. В общем случае формула α -аминокислоты выглядит так:



У α -аминокислот при втором атоме углерода имеются четыре разных заместителя, т. е. все α -аминокислоты, кроме глицина, имеют асимметрический (хиральный) атом углерода и существуют в виде двух энантиомеров – *L*- и *D*-аминокислот. Природные аминокислоты относятся к *L*-ряду. *D*-аминокислоты встречаются в бактериях и пептидных антибиотиках.

Все аминокислоты в водных растворах могут существовать в виде биполярных ионов, причем их суммарный заряд зависит от pH среды. Величина pH, при которой суммарный заряд равен нулю, называется *изоэлектрической точкой*. В изоэлектрической точке аминокислота является цвиттер-ионом, т. е. аминная группа у нее протонирована, а карбоксильная – диссоциирована. В нейтральной области pH большинство аминокислот являются цвиттер-ионами:



Аминокислоты не поглощают свет в видимой области спектра, ароматические аминокислоты поглощают свет в УФ области спектра: триптофан и тирозин при 280 нм, фенилаланин при 260 нм.

Белки дают ряд цветных реакций, обусловленных наличием определенных аминокислотных остатков или общих химических группировок. Эти реакции широко используются для аналитических целей. Среди них наиболее известны нингидриновая реакция, позволяющая проводить количественное определение аминокрупп в белках, пептидах и аминокислотах, а также биуретовая реакция, применяемая для качественного и количественного определения белков и пептидов. При нагревании белка или пептида, но не аминокислоты, с CuSO_4 в щелочном растворе образуется окрашенное в фиолетовый цвет комплексное соединение меди, количество которого можно определить спектрофотометрически. Цветные реакции на отдельные аминокислоты используются для обнаружения пептидов, содержащих соответствующие аминокислотные остатки. Для идентификации гуанидиновой группы аргинина применяется реакция Сакагучи – при взаимодействии с α -нафтолом и гипохлоритом натрия гуанидины в щелочной среде дают красное окрашивание. Индольное кольцо триптофана может быть обнаружено реакцией Эрлиха – красно-фиолетовое окрашивание при реакции с p -диметиламино-бензальдегидом в H_2SO_4 . Реакция Паули позволяет выявить остатки гистидина и тирозина, которые в щелочных растворах реагируют с диазобензол-сульфоокислотой, образуя производные, окрашенные в красный цвет.

Биологическая роль аминокислот:

1) структурные элементы пептидов и белков, так называемые протеиногенные аминокислоты. В состав белков входят 20 аминокислот, которые кодируются генетическим кодом и включаются в белки в процессе трансляции, некоторые из них могут быть фосфорилированы, ацилированы или гидроксильированы;

2) структурные элементы других природных соединений – коферментов, желчных кислот, антибиотиков;

3) сигнальные молекулы. Некоторые из аминокислот являются нейромедиаторами или предшественниками нейромедиаторов, гормонов и гистогормонов;

4) важнейшие метаболиты, например некоторые аминокислоты, являются предшественниками алкалоидов растений, или служат донорами азота, или являются жизненно важными компонентами питания.

Номенклатура, молекулярная масса и значения pK аминокислот приведены в табл. 1.

Таблица 1

Номенклатура, молекулярная масса и значения pK аминокислот

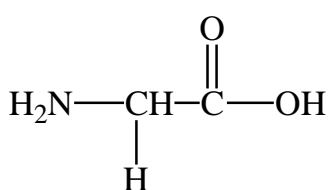
Аминокислота	Обозначение	Молекулярная масса	pK1 (α -COOH)	pK2 (α -NH ₃ ⁺)	pKR (R-группы)
Глицин	Gly G	75	2,34	9,60	–
Аланин	Ala A	89	2,34	9,69	–
Валин	Val V	117	2,32	9,62	–
Лейцин	Leu L	131	2,36	9,60	–
Изолейцин	Ile I	131	2,36	9,68	–
Пролин	Pro P	115	1,99	10,96	–
Фенилаланин	Phe F	165	1,83	9,13	–
Тирозин	Tyr Y	181	2,20	9,11	10,07
Триптофан	Trp W	204	2,38	9,39	–
Серин	Ser S	105	2,21	9,15	13,60
Треонин	Thr T	119	2,11	9,62	13,60
Цистеин	Cys C	121	1,96	10,78	10,28
Метионин	Met M	149	2,28	9,21	–
Аспарагин	Asn N	132	2,02	8,80	–
Глутамин	Gln Q	146	2,17	9,13	–
Аспартат	Asp D	133	1,88	9,60	3,65
Глутамат	Glu E	147	2,19	9,67	4,25
Лизин	Lys K	146	2,18	8,95	10,53
Аргинин	Arg R	174	2,17	9,04	12,48
Гистидин	His H	155	1,82	9,17	6,00

Аминокислоты различаются по растворимости в воде. Это связано с их цвиттерионным характером, а также со способностью радикалов взаимодействовать с водой (гидратироваться). К *гидрофильным* относятся радикалы, содержащие катионные, анионные и полярные незаряженные функциональные группы. К *гидрофобным* – радикалы, содержащие алкильные или арильные группы.

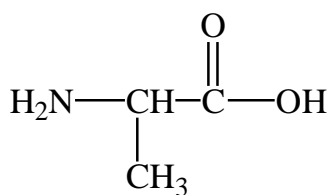
В зависимости от полярности R-групп выделяют четыре класса аминокислот: неполярные, полярные незаряженные, отрицательно заряженные и положительно заряженные.

К неполярным аминокислотам относятся: глицин; аминокислоты с алкильными и арильными боковыми цепями – аланин, валин, лейцин, изолейцин; тирозин, триптофан, фенилаланин; аминокислота – пролин. Они стремятся попасть в гидрофобное окружение «внутри» молекулы белка.

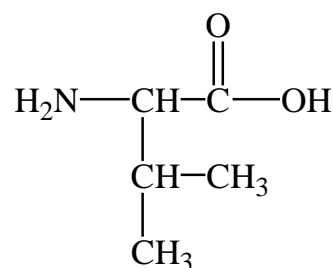
Неполярные алифатические (алкильные) R-группы



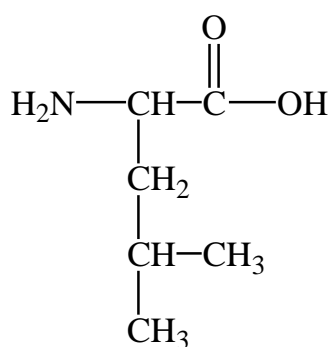
глицин



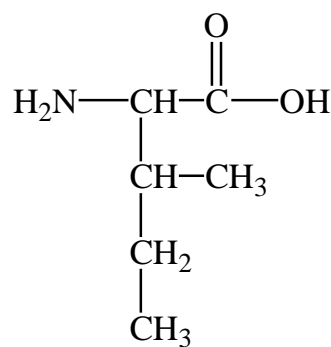
аланин



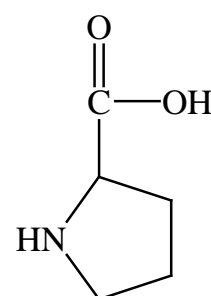
валин



лейцин

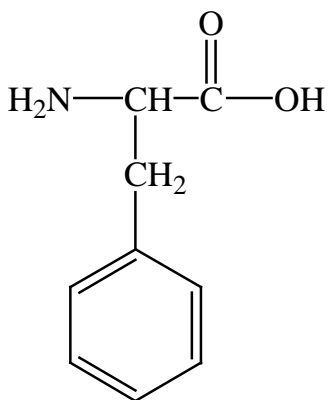


изолейцин

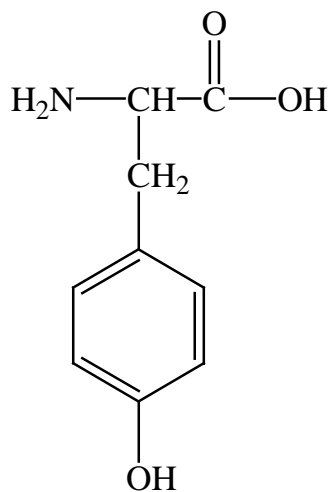


пролин

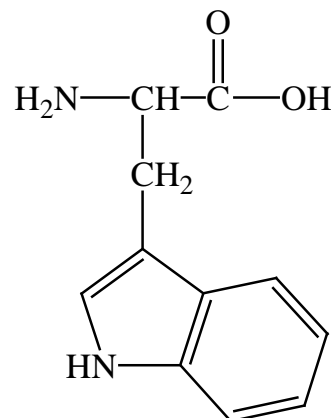
Ароматические (арильные) R-группы



фенилаланин



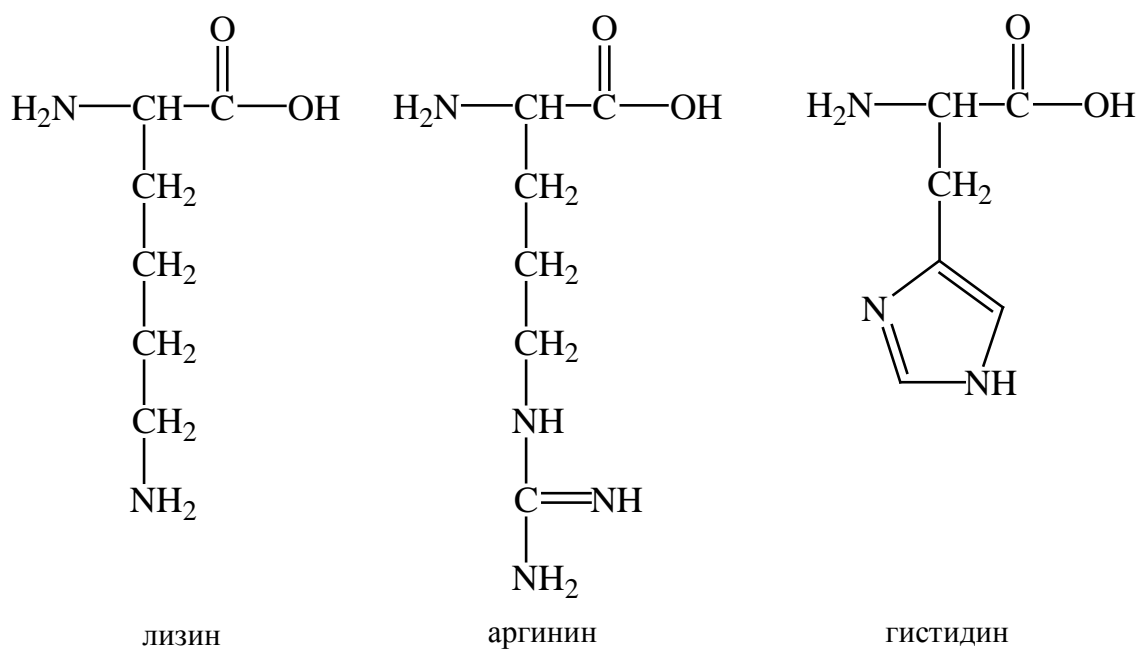
тирозин



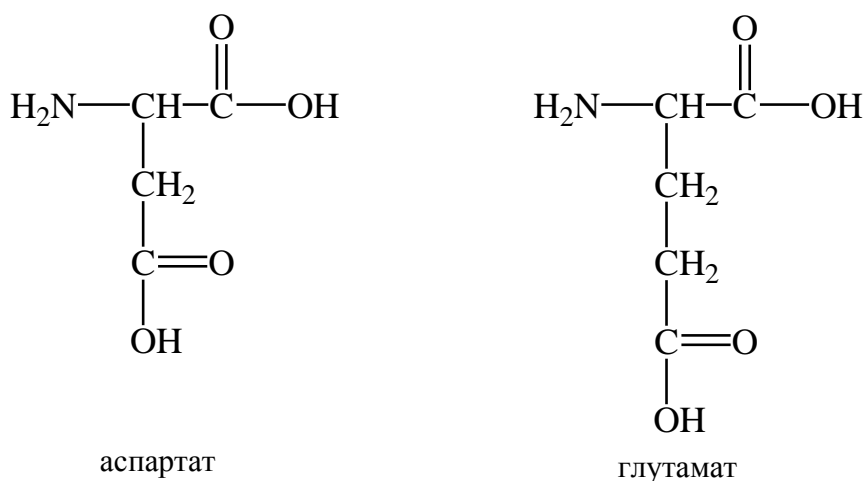
триптофан

К полярным заряженным аминокислотам относятся: положительно заряженные аминокислоты – гистидин, лизин, аргинин; отрицательно заряженные аминокислоты – аспарагиновая и глутаминовая кислота. Они обычно выступают наружу, в водное окружение белка.

Положительно заряженные R-группы



Отрицательно заряженные R-группы



Остальные аминокислоты образуют категорию полярных незаряженных: серин и треонин (аминокислоты-спирты); аспарагин и глутамин (амиды аспарагиновой и глутаминовой кислот); цистеин и метионин (серосодержащие аминокислоты).

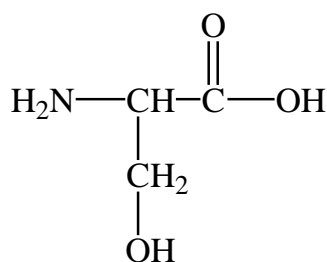
Поскольку при нейтральном значении pH COOH-группы глутаминовой и аспарагиновой кислот полностью диссоциированы, их принято называть *глутаматом* и *аспартатом* независимо от природы присутствующих в среде катионов.

В ряде белков содержатся особые аминокислоты, образующиеся путем модификации обычных аминокислот после их включения

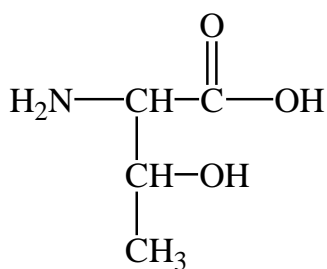
в полипептидную цепь, например, 4-гидроксипролин, фосфосерин, γ -карбоксиглутаминовая кислота и др.

Все аминокислоты, образующиеся при гидролизе белков в достаточно мягких условиях, обнаруживают оптическую активность, т. е. способность вращать плоскость поляризованного света (за исключением глицина).

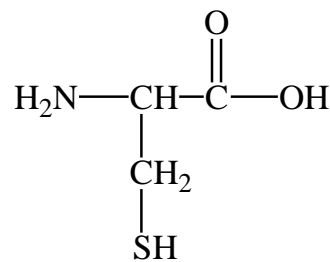
Полярные незаряженные R-группы



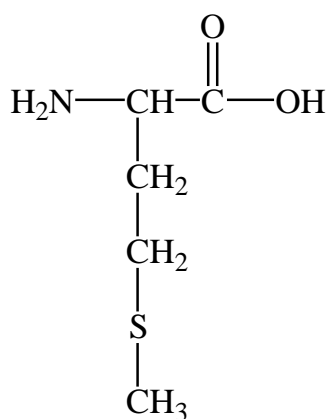
серин



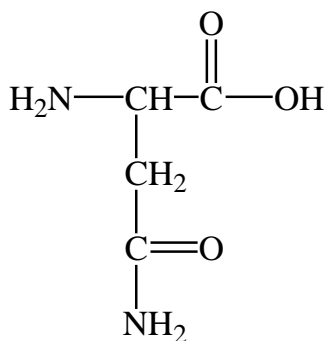
треонин



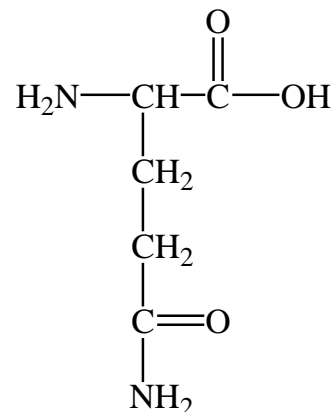
цистеин



метионин

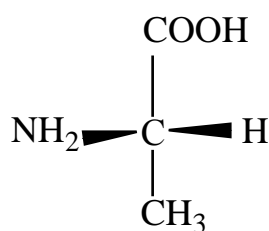


аспарагин

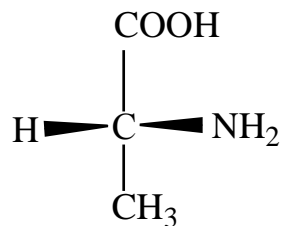


глутамин

Оптической активностью обладают все соединения, способные существовать в двух стереоизомерных формах *L*- и *D*-изомеры. В состав белков входят только *L*-аминокислоты.



L-аланин

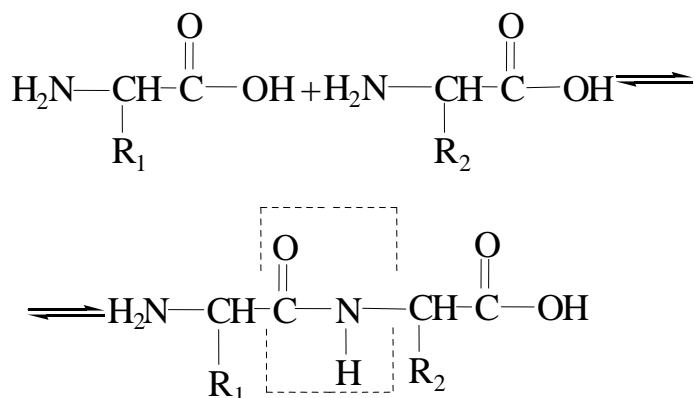


D-аланин

Глицин не имеет асимметрического атома углерода, а треонин и изолейцин содержат по два асимметрических атома углерода. Все остальные аминокислоты имеют один асимметрический атом углерода.

Оптически неактивная форма аминокислоты называется *рацематом*, представляющим собой эквимольную смесь *D*- и *L*-изомеров, и обозначается символом *DL*-.

Мономеры аминокислот, входящих в состав полипептидов, называются *аминокислотными остатками*. Остатки аминокислот соединяются друг с другом пептидной связью, в формировании которой принимает участие α -карбоксильная группа одной аминокислоты и α -аминогруппа другой.



Равновесие этой реакции сдвинуто в сторону образования свободных аминокислот, а не пептида. Поэтому биосинтез полипептидов требует катализа и затрат энергии.

Поскольку дипептид содержит реакционноспособные карбоксильную и аминогруппу, то к нему с помощью новых пептидных связей могут присоединяться другие аминокислотные остатки, в результате образуется полипептид – белок.

Полипептидная цепь состоит из регулярно повторяющихся участков – групп $-\text{NH}-\text{CHR}-\text{CO}-$, образующих основную цепь (скелет, или остов, молекулы), и варибельной части, включающей характерные боковые цепи. R-группы аминокислотных остатков выступают из пептидного остова и формируют в значительной степени поверхность полимера, определяя многие физические и химические свойства белков. Свободное вращение в пептидном остове возможно между атомом азота пептидной группы и соседним α -углеродным атомом, а также между α -углеродным атомом и углеродом карбонильной группы. Благодаря этому линейная структура может приобретать более сложную пространственную конформацию.

Аминокислотный остаток, имеющий свободную α -аминогруппу, называется *N-концевым*, а имеющий свободную α -карбоксильную группу – *C-концевым*.

Структуру пептидов принято изображать с *N*-конца.

Иногда концевые α -амино- и α -карбоксильная группы связываются одна с другой, образуя циклические пептиды.

Пептиды различаются количеством аминокислот, аминокислотным составом и порядком соединения аминокислот.

Пептидные связи очень прочные, и для их химического гидролиза требуются жесткие условия: высокие температура и давление, кислая среда и длительное время.

В живой клетке пептидные связи могут разрываться с помощью протеолитических ферментов, называемых протеазами, или пептид-гидролазами.

Так же, как и аминокислоты, белки являются амфотерными соединениями и в водных растворах заряжены. Для каждого белка существует своя изоэлектрическая точка – значение pH , при котором положительные и отрицательные заряды белка полностью скомпенсированы и суммарный заряд молекулы равен нулю. При значениях pH выше изоэлектрической точки белок несет отрицательный заряд, а при значениях pH ниже изоэлектрической точки – положительный.

СЕКВЕНАТОРЫ. СТРАТЕГИЯ И ТАКТИКА АНАЛИЗА ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ

Определение первичной структуры белков сводится к выяснению порядка расположения аминокислот в полипептидной цепочке. Эту задачу решают с помощью метода **секвенирования** (от англ. *sequence* – последовательность).

Принципиально первичную структуру белков можно определять путем непосредственного анализа аминокислотной последовательности или путем расшифровки нуклеотидной последовательности соответствующих генов с помощью генетического кода. Естественно, наибольшую надежность обеспечивает сочетание этих методов.

Собственно секвенирование на его сегодняшнем уровне позволяет определить аминокислотную последовательность в полипептидах, размер которых не превышает несколько десятков аминокислотных остатков. В то же время исследуемые полипептидные фрагменты значительно короче тех природных белков, с которыми приходится иметь дело. Поэтому необходимо предварительное разрезание исходного полипептида на короткие фрагменты. После секвенирования полученных фрагментов их необходимо снова сшить в первоначальной последовательности.

Таким образом, определение первичной последовательности белка сводится к следующим основным этапам:

- 1) расщепление белка на несколько фрагментов длиной, доступной для секвенирования;
- 2) секвенирование каждого из полученных фрагментов;
- 3) сборка полной структуры белка из установленных структур его фрагментов.

Исследование первичной структуры белка состоит из следующих стадий:

- определение его молекулярной массы;
- определение удельного аминокислотного состава (АК-состава);
- определение *N*- и *C*-концевых аминокислотных остатков;
- расщепление полипептидной цепи на фрагменты;
- разделение полученных фрагментов;
- аминокислотный анализ каждого фрагмента;
- расщепление исходной полипептидной цепи еще одним способом;
- разделение полученных фрагментов;
- аминокислотный анализ каждого фрагмента;
- установление первичной структуры полипептида с учетом перекрывающихся последовательностей фрагментов обоих расщеплений.

Поскольку пока не существует метода, позволяющего установить полную первичную структуру белка на целой молекуле, полипептидную цепь подвергают специфичному расщеплению химическими реагентами или протеолитическими ферментами. Смесь образовавшихся пептидных фрагментов разделяют и для каждого из них определяют аминокислотный состав и аминокислотную последовательность. После того как структура всех фрагментов установлена, необходимо выяснить порядок их расположения в исходной полипептидной цепи. Для этого белок подвергают расщеплению при помощи другого агента и получают второй, отличный от первого набор пептидных фрагментов, которые разделяют и анализируют аналогичным образом.

1. *Определение молекулярной массы* (нижеперечисленные методы подробно рассмотрены в теме 3):

- по вязкости;
- по скорости седиментации (метод ультрацентрифугирования);
- гельхроматография;
- электрофорез в ПААГ в диссоциирующих условиях.

2. *Определение АК-состава.* Анализ аминокислотного состава включает полный кислотный гидролиз исследуемого белка или пеп-

тида с помощью 6 н. соляной кислоты и количественное определение всех аминокислот в гидролизате. Гидролиз образца проводится в запаянных ампулах в вакууме при 150°C в течение 6 ч. Количественное определение аминокислот в гидролизате белка или пептида проводится с помощью аминокислотного анализатора.

3. Определение N- и C-аминокислотных остатков. В полипептидной цепи белка с одной стороны расположен аминокислотный остаток, несущий свободную α -аминогруппу (амино- или N-концевой остаток), а с другой – остаток со свободной α -карбоксильной группой (карбоксильный, или C-концевой остаток). Анализ концевых остатков играет важную роль в процессе определения аминокислотной последовательности белка. На первом этапе исследования он дает возможность оценить число полипептидных цепей, составляющих молекулу белка, и степень гомогенности исследуемого препарата. На последующих этапах с помощью анализа N-концевых аминокислотных остатков осуществляется контроль за процессом разделения пептидных фрагментов.

Реакции определения N-концевых аминокислотных остатков:

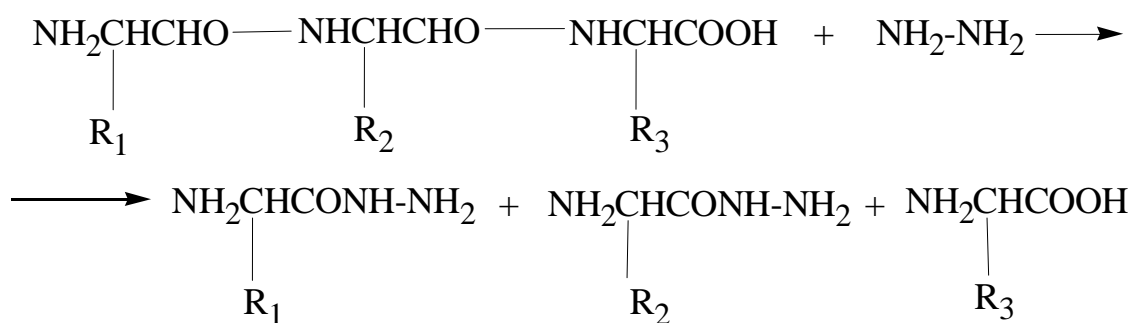
1) один из первых методов определения N-концевых аминокислотных остатков был предложен Ф. Сенгером в 1945 г. При реакции α -аминогруппы пептида или белка с 2,4-динитрофторбензолом получается динитрофенильное (ДНФ) производное, окрашенное в желтый цвет. Последующий кислотный гидролиз (5,7 н. HCl) приводит к разрыву пептидных связей и образованию ДНФ-производного N-концевой аминокислоты. ДНФ-аминокислота экстрагируется эфиром и идентифицируется хроматографическим методом в присутствии стандартов;

2) метод дансирования. Наибольшее применение для определения N-концевых остатков в настоящее время находит разработанный в 1963 г. В. Греем и Б. Хартли дансильный метод. Как и метод динитрофенилирования, основан на введении в аминогруппы белка «метки», не удаляющейся при последующем гидролизе. Его первая стадия – реакция дансилхлорида (1-диметиламинафталин-5-сульфохлорида) с непротонированной α -аминогруппой пептида или белка с образованием дансилпептида (ДНС-пептида). На следующей стадии ДНС-пептид гидролизует (5,7 н. HCl, 105°C, 12–16 ч) и освобождается N-концевая α -ДНС-аминокислота. ДНС-аминокислоты обладают интенсивной флуоресценцией в ультрафиолетовой области спектра (365 нм); обычно для их идентификации достаточно 0,1–0,5 нмоль вещества.

Имеется ряд методов, с помощью которых можно определять как *N*-концевой аминокислотный остаток, так и аминокислотную последовательность. К ним относятся деградация по методу Эдмана и ферментативный гидролиз аминопептидазами. Эти методы будут подробно рассмотрены ниже при описании аминокислотной последовательности пептидов.

Реакции определения C-концевых аминокислотных остатков:

1) среди химических методов определения *C*-концевых аминокислотных остатков заслуживают внимания метод гидразинолиза, предложенный С. Акабори, и оксазолоновый. В первом при нагревании пептида или белка с безводным гидразином при 100–120°C пептидные связи гидролизуются с образованием гидразидов аминокислот. *C*-концевая аминокислота остается в виде свободной аминокислоты и может быть выделена из реакционной смеси и идентифицирована.



Метод имеет ряд ограничений. При гидразинолизе разрушаются глутамин, аспарагин, цистеин и цистин; аргинин теряет гуанидиновую группировку с образованием орнитина. Гидразиды серина, треонина и глицина лабильны и легко превращаются в свободные аминокислоты, что затрудняет интерпретацию результатов;

2) оксазолоновый метод, часто называемый методом тритиевой метки, основан на способности *C*-концевого аминокислотного остатка под действием уксусного ангидрида подвергаться циклизации с образованием оксазолона. В щелочных условиях резко увеличивается подвижность атомов водорода в положении 4 оксазолонового кольца и они могут быть легко заменены тритием. Образующиеся в результате последующего кислотного гидролиза тритиированного пептида или белка продукты реакции содержат радиоактивно меченную *C*-концевую аминокислоту. Хроматографирование гидролизата и измерение радиоактивности позволяют идентифицировать *C*-концевую аминокислоту пептида или белка;

3) чаще всего для определения *C*-концевых аминокислотных остатков используют ферментативный гидролиз карбоксипептидазами,

позволяющий анализировать также и С-концевую аминокислотную последовательность. Карбоксипептидаза гидролизует только те пептидные связи, которые образованы С-концевой аминокислотой, имеющей свободную α -карбоксильную группу. Поэтому под действием этого фермента от пептида последовательно отщепляются аминокислоты, начиная с С-концевой. Это позволяет определить взаимное расположение чередующихся аминокислотных остатков.

В результате идентификации N- и С-концевых остатков полипептида получают две важные реперные точки для определения его аминокислотной последовательности (первичной структуры).

4. Фрагментация полипептидной цепи.

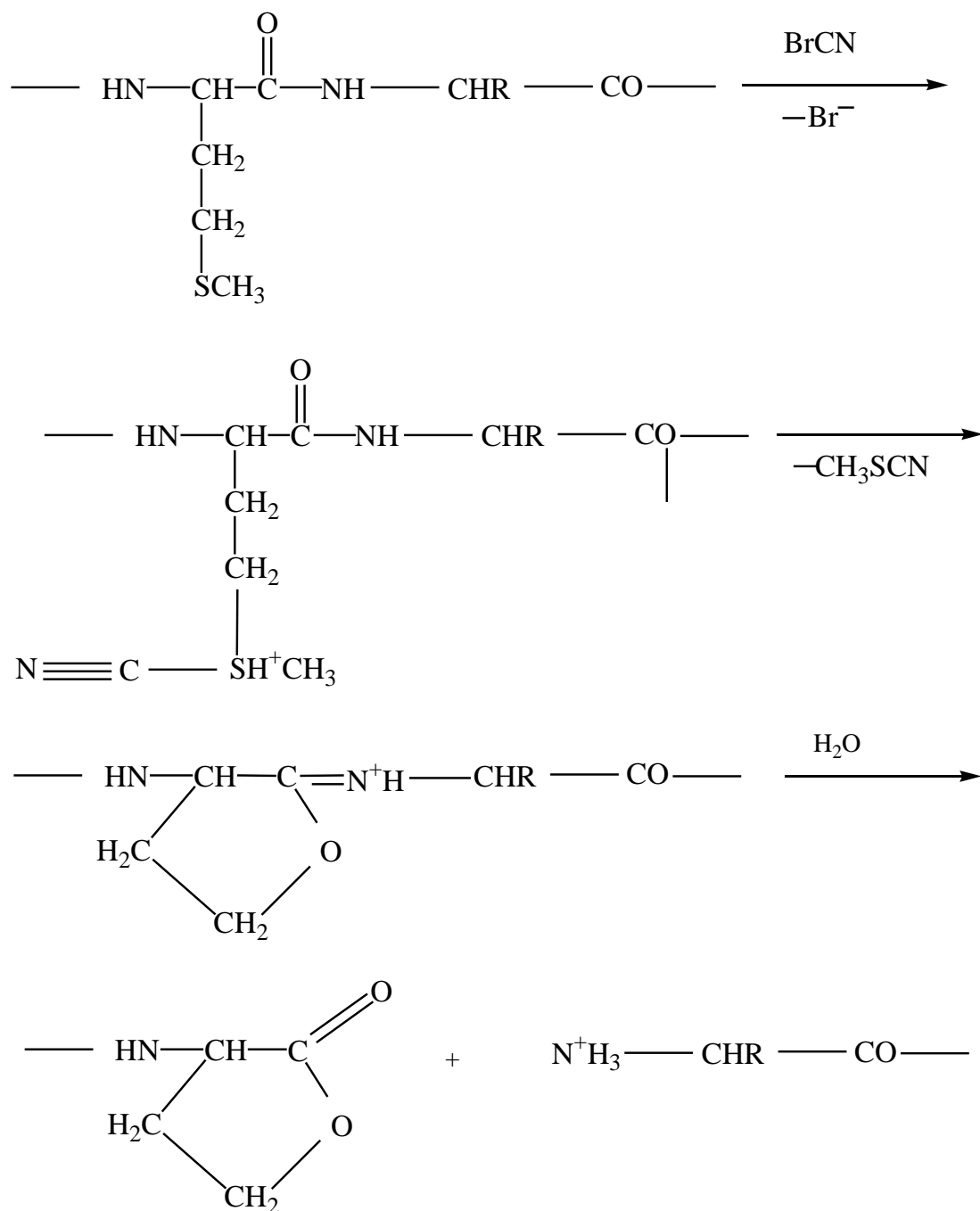
Ферментативные методы. Для специфического расщепления белков по определенным точкам применяются как ферментативные, так и химические методы. Из ферментов, катализирующих гидролиз белков по определенным точкам, наиболее широко используют трипсин и химотрипсин. Трипсин катализирует гидролиз пептидных связей, расположенных после остатков лизина и аргинина. Химотрипсин преимущественно расщепляет белки после остатков ароматических аминокислот – фенилаланина, тирозина и триптофана. При необходимости специфичность трипсина может быть повышена или изменена. Например, обработка цитраконовым ангидридом исследуемого белка приводит к ацилированию остатков лизина. В таком модифицированном белке расщепление будет проходить только по остаткам аргинина. Также при исследовании первичной структуры белков широкое применение находит протеиназа, которая также относится к классу сериновых протеиназ. Фермент имеет два максимума протеолитической активности при рН 4,0 и 7,8. Протеиназа с высоким выходом расщепляет пептидные связи, образованные карбоксильной группой глутаминовой кислоты.

В распоряжении исследователей имеется также большой набор менее специфичных протеолитических ферментов (пепсин, эластаза, субтилизин, папаин, проназа и др.). Эти ферменты используются в основном при дополнительной фрагментации пептидов. Их субстратная специфичность определяется природой аминокислотных остатков, не только образующих гидролизуюмую связь, но и более удаленных по цепи.

Химические методы:

1) среди химических методов фрагментации белков наиболее специфичным и чаще всего применяемым является расщепление бромцианом по остаткам метионина.

Реакция с бромцианом проходит с образованием промежуточного циансульфониевого производного метионина, спонтанно превращающегося в кислых условиях в иминолактон гомосерина, который, в свою очередь, быстро гидролизуется с разрывом иминной связи. Получающийся на С-конце пептидов лактон гомосерина далее частично гидролизуется до гомосерина (HSer), в результате чего каждый пептидный фрагмент, за исключением С-концевого, существует в двух формах – гомосериновой и гомосеринлактоновой;



2) большое число методов предложено для расщепления белка по карбонильной группе остатка триптофана. Одним из используемых для этой цели реагентов является *N*-бромсукцинимид;

3) реакция тиолдисульфидного обмена. В качестве реагентов используют восстановленный глутатион, 2-меркаптоэтанол, дитиотреитол.

5. *Определение последовательности пептидных фрагментов.*

На этой стадии устанавливается аминокислотная последовательность в каждом из пептидных фрагментов, полученных на предыдущей стадии. Для этой цели обычно используют химический метод, разработанный Пером Эдманом. Расщепление по Эдману сводится к тому, что метится и отщепляется только *N*-концевой остаток пептида, а все остальные пептидные связи не затрагиваются. После идентификации отщепленного *N*-концевого остатка метка вводится в следующий, ставший теперь *N*-концевым остаток, который точно так же отщепляется, проходя через ту же серию реакций. Так, отщепляя остаток за остатком, можно определить всю аминокислотную последовательность пептида, используя для этой цели всего одну пробу. В методе Эдмана вначале пептид взаимодействует с фенилизотиоционатом, который присоединяется к свободной α -аминогруппе *N*-концевого остатка. Обработка пептида холодной разбавленной кислотой приводит к отщеплению *N*-концевого остатка в виде фенилтиогидантоинового производного, которое можно идентифицировать хроматографическими методами. Остальная часть пептидной цепи после удаления *N*-концевого остатка оказывается неповрежденной. Операция повторяется столько раз, сколько остатков содержит пептид. Таким способом можно легко определить аминокислотную последовательность пептидов, содержащих 10–20 аминокислотных остатков. Определение аминокислотной последовательности проводится для всех фрагментов, образовавшихся при расщеплении. После этого возникает следующая проблема – определить, в каком порядке располагались фрагменты в первоначальной полипептидной цепи.

Автоматическое определение аминокислотной последовательности. Крупным достижением в области структурных исследований белков явилось создание в 1967 г. П. Эдманом и Дж. Бэггом **секвенатора** – прибора, который с высокой эффективностью осуществляет последовательное автоматическое отщепление *N*-концевых аминокислотных остатков по методу Эдмана. В современных секвенаторах реализованы различные методы определения аминокислотной последовательности.

6. Расщепление исходной полипептидной цепи еще одним способом. Чтобы установить порядок расположения образовавшихся пептидных фрагментов, берут новую порцию препарата исходного полипептида и расщепляют его на более мелкие фрагменты каким-либо другим способом, при помощи которого расщепляются пептидные связи, устойчивые к действию предыдущего реагента. Каждый из полученных коротких пептидов подвергается последовательному расщеплению по методу Эдмана (так же, как на предыдущей стадии), и таким путем устанавливают их аминокислотную последовательность.

7. Установление первичной структуры полипептида с учетом перекрывающихся последовательностей фрагментов обоих расщеплений. Аминокислотные последовательности в пептидных фрагментах, полученных двумя способами, сравнивают, чтобы во втором наборе найти пептиды, в которых последовательности отдельных участков совпадали бы с последовательностями тех или иных участков пептидов первого набора. Пептиды из второго набора с перекрывающимися участками позволяют соединить в правильном порядке пептидные фрагменты, полученные в результате первого расщепления исходной полипептидной цепи.

Иногда второго расщепления полипептида на фрагменты оказывается недостаточно, для того чтобы найти перекрывающиеся участки для всех пептидов, полученных после первого расщепления. В этом случае применяется третий, а иногда и четвертый способ расщепления, чтобы получить набор пептидов, обеспечивающих полное перекрывание всех участков и установление полной последовательности аминокислот в исходной полипептидной цепи.

Тема 3. Структурная организация белков и пептидов. Методы выделения

Аминокислотные остатки в пептидной цепи белков не чередуются случайным образом, а расположены в определенном порядке. Линейная последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи называется **первичной структурой белка**. Она определяет другие уровни организации белков – вторичную, третичную и четвертичную структуры.

Последовательность аминокислот в первичной структуре белка является специфической для данного белка, отличающей его от любого другого индивидуального белка. Замена даже одной аминокислоты на другую может привести к полной утрате биологической активности белка.

Первичная структура белка генетически детерминирована и воспроизводится в ходе транскрипции и трансляции. Первичная структура стабилизируется ковалентными связями – пептидной, а в некоторых белках и дисульфидной. Последняя образуется при окислении остатков цистеина между разными участками одной и той же полипептидной цепи.

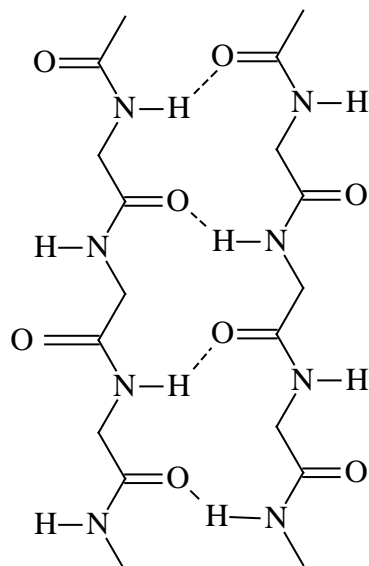
Вторичная структура белка – это пространственная структура, образующаяся в результате взаимодействий между функциональными группами пептидного остова.

Пептидная цепь содержит множество СО- и NH-групп пептидных связей, каждая из которых потенциально способна участвовать в образовании водородных связей. Существуют два главных типа структур, которые позволяют это осуществить: α -спираль, в которую цепь сворачивается, как шнур от телефонной трубки, и складчатая β -структура, в которой бок о бок уложены вытянутые участки одной или нескольких цепей. Обе эти структуры весьма стабильны.

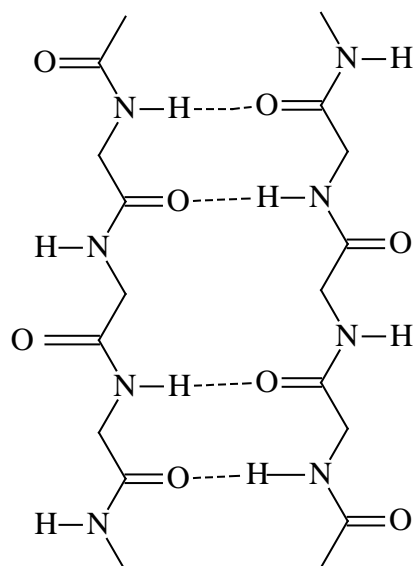
α -Спираль характеризуется предельно плотной упаковкой скрученной полипептидной цепи, на каждый виток правозакрученной спирали приходится 3,6 аминокислотных остатка, радикалы которых направлены всегда наружу и немного назад, т. е. в начало полипептидной цепи.

β -Складчатость – это слоистая структура, образуемая водородными связями между линейно расположенными пептидными фрагментами. Обе цепи могут быть независимыми или принадлежать одной молекуле полипептида. Если цепи ориентированы в одном направлении, то такая β -структура называется **параллельной**.

В случае противоположного направления цепей, т. е. когда *N*-конец одной цепи совпадает с *C*-концом другой цепи, β -структура называется **антипараллельной**. Энергетически более предпочтительна антипараллельная β -складчатость с почти линейными водородными мостиками.



параллельная β -складчатость



антипараллельная β -складчатость

В отличие от α -спирали, насыщенной водородными связями, каждый участок цепи β -складчатости открыт для образования дополнительных водородных связей. Боковые радикалы аминокислот ориентированы почти перпендикулярно плоскости листа попеременно вверх и вниз.

Третичная структура белка – это пространственное расположение молекулы белка, стабилизируемое связями между боковыми радикалами аминокислот.

Начиная с третичной структуры белок способен выполнять свои собственные ему биологические функции. В основе функционирования белков лежит то, что при укладке третичной структуры на поверхности белка образуются участки, которые могут присоединять к себе другие молекулы, называемые *лигандами*. Высокая специфичность взаимодействия белка с лигандом обеспечивается комплементарностью структуры активного центра структуре лиганда. **Комплементарность** – это пространственное и химическое соответствие взаимодействующих поверхностей. Для большей части белков третичная структура – максимальный уровень укладки.

Четвертичная структура характерна для белков, состоящих из двух и более полипептидных цепей, связанных между собой исключительно нековалентными связями, в основном водородными и электро-

статическими. Чаще всего белки содержат две или четыре субъединицы, более четырех обычно имеют регуляторные белки.

Примеры структурной организации белков представлены на рис. 1.

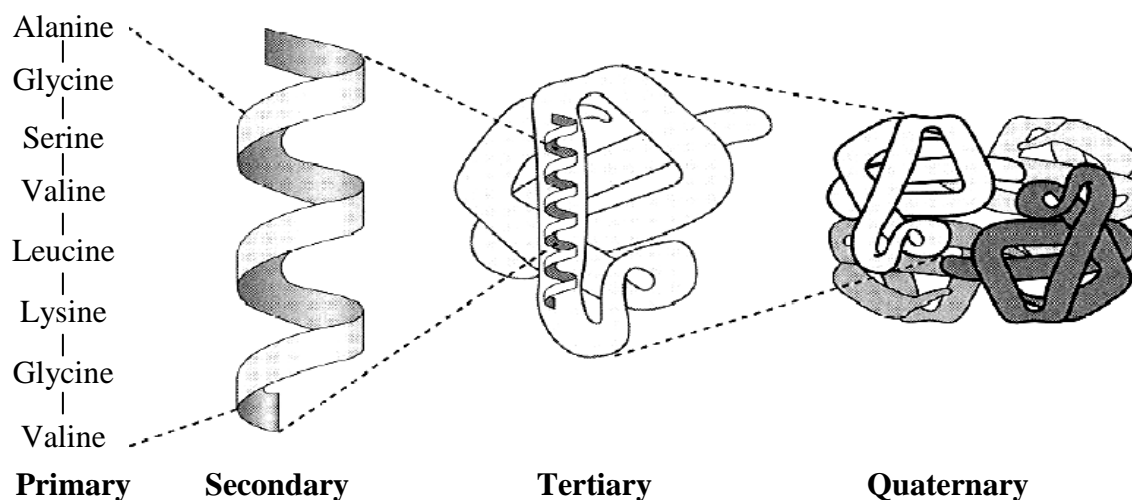


Рис. 1. Структурная организация белковой молекулы

Белки, имеющие четвертичную структуру, часто называют *олигомерными*. Различают гомомерные и гетеромерные белки. К *гомомерным* относятся белки, у которых все субъединицы имеют одинаковое строение, например, фермент каталаза состоит из четырех абсолютно одинаковых субъединиц. *Гетеромерные* белки имеют разные субъединицы, например, фермент РНК-полимераза состоит из пяти разных по строению субъединиц, выполняющих разные функции.

Методы выделения белков:

- метод мембранной фильтрации;
- осаждение белков растворами солей или органических растворителей;
- гель-хроматография;
- ультрацентрифугирование;
- электрофорез.

Индивидуальные белки различаются по физико-химическим свойствам:

- молекулярной массе (набору аминокислот, первичной структуре);
- форме молекул (третичной структуре);
- суммарному заряду, величина которого зависит от соотношения анионных и катионных групп аминокислот;
- соотношению полярных и неполярных радикалов аминокислот;
- степени устойчивости к воздействию различных денатурирующих агентов.

При выделении индивидуальных белков обычно сталкиваются со следующими трудностями:

1) низкое содержание белка в исходном материале (часто менее 0,1% от сухой массы);

2) лабильность белков, что не позволяет применять традиционные методы органической химии (нагревание, перегонка, кристаллизация);

3) связь белков со структурными элементами клеток или наличие их в белково-липидных, белково-углеводных и других комплексах биологических жидкостей;

4) наличие близких физико-химических свойств у разделяемых белков.

Последовательность операций по выделению и очистке индивидуальных белков следующая:

- измельчение биологического материала до гомогенного состояния (гомогенизация);
- перевод белков в растворенное состояние (солюбилизация, экстракция);
- фракционирование белков и получение обогащенной фракции;
- выделение индивидуального белка из обогащенной фракции;
- определение гомогенности выделенного белка.

Гомогенизация биологического материала. Большинство белков, в том числе и ферментов, локализовано внутри клеток. Поэтому перед выделением белков из биологических объектов (органов и тканей животных, клеток микроорганизмов и растений) исследуемый материал тщательно измельчают до гомогенного состояния, т. е. подвергают дезинтеграции вплоть до разрушения клеточной структуры с целью высвобождения клеточного содержимого. Эту процедуру называют **гомогенизацией**. Для разрушения клеток применяют ряд физических методов: гомогенизацию с использованием механических гомогенизаторов различных конструкций, ультразвуковую дезинтеграцию, замораживание-оттаивание и др. Наиболее простым методом является гомогенизация путем растирания клеток с окисью алюминия или абразивным порошком в ступке при помощи пестика.

Солюбилизация и/или экстракция белков. Гомогенизацию биологического материала обычно сочетают с одновременной солюбилизацией или экстракцией белков из гомогенатов с целью перевода белков в растворенное состояние. В качестве экстрагентов используют 8–10%-ные растворы солей (NaCl, KCl), водные растворы глицерина, слабые растворы сахарозы (особенно для солюбилизации мембранных белков), различные буферные растворы, а также органические растворители.

На растворимость белков при их солюбилизации или экстракции большое влияние оказывает рН среды, поэтому в белковой химии широко применяют буферные растворы с близкими к нейтральным значениями рН.

Не все белки способны существовать в солюбилизированном состоянии, будучи изолированными от их нормального клеточного окружения. Это относится к белкам, структурно связанным с нерастворимыми компонентами клетки, такими как плазматическая мембрана, митохондрии, хлоропласты, ядерные мембраны и др. Поэтому успех выделения и очистки таких белков зависит от того, насколько полно их можно отделить от других соединений, входящих в состав клеточных структур.

Большинство мембранно-связанных белков можно экстрагировать из мембран в присутствии детергентов, разрушающих гидрофобные взаимодействия между белками и липидами или между белковыми молекулами в составе комплексов белков с молекулами липидов или с другими белками и в конечном счете разрушающих липидный бислой.

После солюбилизации или экстракции белков полученный экстракт осветляют путем осаждения обломков клеток центрифугированием. Размер частиц является определяющим фактором при выборе скорости и продолжительности центрифугирования.

Фракционирование белков и получение обогащенной фракции. Методы фракционирования белков основаны на их различиях по растворимости в воде, изменению гидродинамического радиуса, подвижности в зависимости от молекулярной массы и степени ионизации белковой молекулы. К ним относятся такие методы, как высаливание, осаждение органическими растворителями и изоэлектрическое осаждение. Как указывалось выше, белковая молекула в растворе удерживается двумя факторами – зарядом и гидратной оболочкой. При устранении этих факторов устойчивости белки осаждаются. Методы высаливания, осаждения белков органическими растворителями и изоэлектрического осаждения являются способами обратимого осаждения белков, при котором белковые молекулы не подвергаются денатурации и их осадки могут быть снова растворены с сохранением своих нативных свойств.

Однако существуют способы необратимого осаждения белков, когда происходит глубокая денатурация белка, при которой нековалентные связи в белковой молекуле разрываются, и денатурированный белок не способен восстановить свои первоначальные свойства. К ним относятся денатурация под действием температуры и путем изменения рН.

Обязательной стадией, предшествующей выделению индивидуального белка из обогащенной фракции, является освобождение белковых растворов от низкомолекулярных соединений (сульфата аммония, органических растворителей). Для этого используют методы диализа и гель-фильтрации.

Диализом называется процесс разделения высокомолекулярных и низкомолекулярных веществ с помощью полупроницаемых мембран. При диализе применяют полупроницаемые мембраны (целлофан), диаметр пор которых варьируется в широких пределах. Этот метод основан на неспособности белков проходить через полупроницаемую мембрану, которая легко пропускает низкомолекулярные вещества. Диффузия последних через мембраны обеспечивается разностью концентраций подлежащего удалению вещества в исследуемом растворе и чистом растворителе, находящихся по разные стороны мембраны.

Белковый раствор помещают в целлофановый мешочек, который погружают в чистый растворитель (воду, физиологический или буферный раствор). Низкомолекулярные вещества будут выходить из мешочка в растворитель до тех пор, пока их концентрации по обе стороны мембраны не станут равными. Для ускорения диффузии рекомендуется регулярно менять растворитель.

Устройство для диализа представлено на рис. 2.

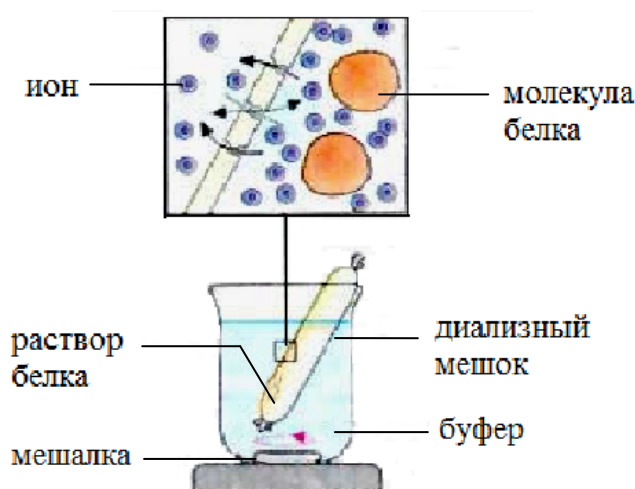


Рис. 2. Устройство для диализа

Выделение индивидуального белка из обогащенной фракции. Методы выделения индивидуального белка из смеси белков с близкими физико-химическими свойствами основаны на различиях белков: по молекулярной массе (методы ультрацентрифугирования, ультрафильтрации и гель-фильтрации), заряду (ионообменная хроматогра-

фия), степени адсорбции белков и их растворимости в соответствующем растворителе (адсорбционная хроматография), способности белков к специфическим взаимодействиям с аффинным лигандом (аффинная хроматография).

Ультрацентрифугирование – это высокоскоростное центрифугирование. Разделение веществ с помощью центрифугирования основано на разном поведении частиц в возрастающем центробежном поле. Частицы, имеющие разную плотность, форму или молекулярную массу, осаждаются с разной скоростью. Скорость седиментации частиц зависит от центробежного ускорения g .

Суспензию белков в центрифужной пробирке помещают в ротор ультрацентрифуги. Ультрацентрифугирование позволяет получить в центрифужных пробирках, вращающихся со скоростью до 85 000 об./мин, центробежное ускорение 30 000–50 000 g . При этом скорость осаждения белков пропорциональна их молекулярной массе.

Ультрацентрифуги снабжены холодильной установкой для предотвращения перегрева ротора вследствие трения его о воздух. Центрифужные пробирки и их содержимое должны быть тщательно уравновешены. Уравновешенные пробирки следует располагать в роторе одну против другой. Схема ультрацентрифугирования образцов представлена на рис. 3.

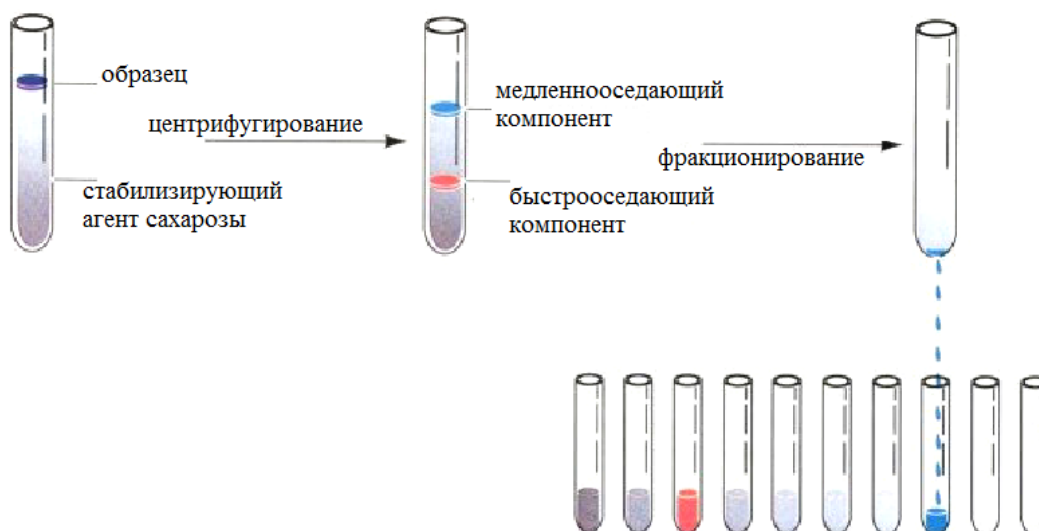


Рис. 3. Схема ультрацентрифугирования образцов

Гель-фильтрация (гель-хроматография) представляет собой метод разделения веществ при помощи гелей, основанный на различиях в размере молекул. Является вариантом жидкостно-жидкостной хроматографии, когда и подвижной, и неподвижной фазами служат раз-

ные жидкости. Но в отличие от нее в гель-фильтрации подвижной и неподвижной фазами служит одна и та же жидкость. При этом та часть жидкости, которая протекает вдоль слоя гранул геля, служит подвижной фазой, а другая часть той же жидкости, проникающая в поры гранул геля, – неподвижной. Гель-фильтрация осуществляется с помощью молекулярных сит – инертных гидратированных материалов, представляющих собой пористые гранулы. Их получают на основе декстрана (сефадекса – бактериального полисахарида), агарозы (из некоторых морских водорослей), акриламидных гелей (акрилекс) или полиоксиэтилена (Тоуорpearl). Гель-фильтрацию проводят на колонках, заполненных гранулами набухшего геля. Неподвижная фаза представлена жидкостью, находящейся внутри пористых гранул, – точно такой же, как и жидкость подвижной фазы, протекающей между ними. Благодаря адгезии с поверхностью пространственной сетки полимера, образующего гранулы, жидкость внутри них остается неподвижной и не увлекается потоком подвижной фазы.

В процессе элюирования молекулы, размер которых превышает размер пор гранул (высокомолекулярные соединения), не проникают в гранулы геля и движутся с высокой скоростью вместе с растворителем только в пространстве между гранулами и первыми выходят из колонки. Молекулы, размер которых меньше размера пор гранул (низкомолекулярные соединения), диффундируют в гранулы и обратно, поэтому их вымывание растворителем (элюирование) из колонки замедляется. Поскольку степень диффузии в гранулы геля зависит от размеров молекул, вещества элюируются с колонки в порядке уменьшения их молекулярной массы. Чем меньше молекулярная масса вещества, тем больший объем элюента требуется для вымывания его из колонки. Схема гель-фильтрации представлена на рис. 4.

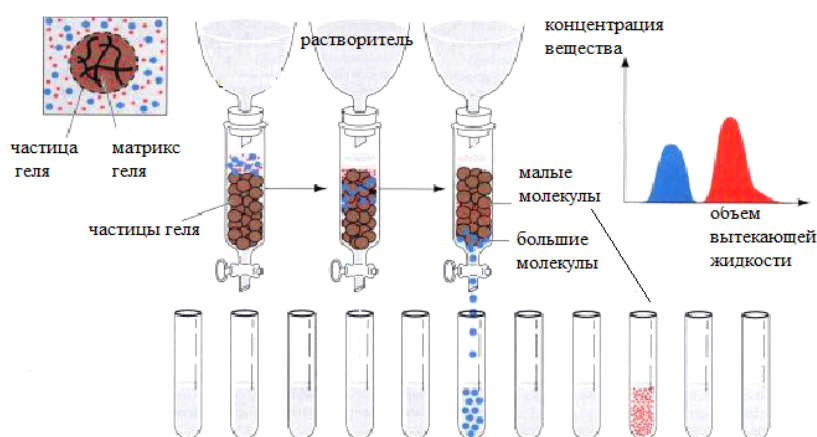


Рис. 4. Принцип гель-фильтрации

Распределение вещества по колонке, заполненной гранулами геля, зависит от общего объема растворителя внутри и снаружи гранул геля. Это распределение определяется коэффициентом распределения K_{av} , который зависит от размера молекул вещества.

Коэффициент распределения K_{av} (*available* – доступный) характеризует движение хроматографической зоны вещества вдоль колонки при гель-фильтрации и определяет долю пор гранул геля, которую может занимать данный белок. K_{av} определяется соотношением

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o},$$

где V_e – объем элюирования данного белка, мл; V_o – свободный объем колонки (объем жидкости между гранулами геля), мл; V_t – объем пустой колонки, мл.

Как видно из соотношения, K_{av} прямо пропорционален объему элюирования данного белка. Для крупных молекул,двигающихся по колонке в свободном объеме и отсутствующих в растворителе внутри гранул геля, $K_{av} = 0$ ($V_e = V_o$). Для мелких молекул, равномерно распределяющихся в растворителе внутри и снаружи гранул геля и требующих большого объема элюирования, $K_{av} = 1$. Молекулы средних размеров частично проникают в гранулы геля и для них $0 < K_{av} < 1$. Они движутся вдоль колонки быстрее, чем мелкие молекулы, но медленнее, чем крупные, и для них оказывается доступной только часть объема неподвижной фазы. Следовательно, скорости перемещения отдельных белков по колонке обратно пропорциональны их коэффициентам распределения.

При определении молекулярной массы исследуемого белка предварительно проводят калибровку колонки, пропуская через нее белки с известной молекулярной массой (белки-маркеры) в тех же условиях и определяя объемы элюирования для каждого из них. На основании этого строят калибровочный график зависимости молекулярной массы (в логарифмической шкале) белков-маркеров от объема элюирования или связанных с ним параметров, например коэффициента распределения белка между подвижной и неподвижной фазами K_{av} . Этот параметр в отличие от объема элюирования более стабилен и не зависит от объема колонки.

Определение гомогенности выделенного белка. Для характеристики гомогенности выделенного белка используют метод электрофореза. **Электрофорез** – метод, в основе которого лежит перемещение белковых молекул в электрическом поле.

Молекула белка в растворе при любом значении рН, отличающемся от изоэлектрической точки данного белка, имеет определенный суммарный заряд, который обусловлен наличием функциональных групп боковых цепей аминокислотных остатков, способных к электролитической диссоциации. Кроме того, молекулы белков с близкими по величине зарядами, но различающимися молекулярными массами отличаются друг от друга отношением массы к заряду. Под действием внешнего электрического поля заряженные молекулы белка перемещаются к противоположно заряженному полюсу (катоду или аноду) в зависимости от знака их суммарного заряда. Такое явление носит название электрофореза. Скорость движения катионов к катоду и анионов к аноду зависит от соотношения между движущей силой электрического поля, действующей на заряженные ионы, и замедляющими движение ионов силами взаимодействия между молекулами и окружающей средой, в основном силами трения и электростатическими силами.

Мерой электрофоретической подвижности белков является скорость их движения, см/с, при напряженности электрического поля 1 В/см. Знак величины электрофоретической подвижности совпадает со знаком суммарного заряда белка.

Электрофоретическая подвижность заряженных молекул зависит от их заряда, молекулярной массы (размера) и формы. Эта величина возрастает с увеличением суммарного заряда молекулы, который зависит от рН среды. Чем крупнее молекулы, тем меньше их подвижность. Это связано с возрастанием сил трения и электростатических взаимодействий крупных молекул с окружающей средой по сравнению с молекулами меньших размеров. Молекулы одинакового размера, но различной формы, например фибриллярные и глобулярные белки, также обладают разной подвижностью, что обусловлено различиями в силе трения и электростатических взаимодействиях.

Тема 4. Химический синтез и химическая модификация белков и пептидов

Пептидный синтез – это построение пептидной цепи путем соединения аминокислот с помощью химических методов. Обычно речь идет о получении пептидов, содержащих до 40–45 аминокислот, таким способом можно осуществить синтез и небольших белков.

В зависимости от используемых методических приемов и характера синтезируемого конечного продукта различают следующие типы пептидного синтеза:

1) классический пептидный синтез в растворе. Подразделяется на ступенчатый синтез линейных пептидов, осуществляемый последовательным присоединением аминокислот от *C*-конца к *N*-концу цепи, и на блочный синтез линейных пептидов, когда построение цепи ведется из предварительно синтезированных фрагментов;

2) синтез пептидов на полимерном носителе. Растущая полипептидная цепь ковалентно присоединена к нерастворимому или растворимому полимеру, и отделение ее от полимера осуществляется на завершающей стадии синтеза. При использовании нерастворимого носителя принято говорить о твердофазном синтезе, существующем в настоящее время в полностью автоматизированном варианте. Созданные для этих целей приборы получили название синтезаторов. В некоторых случаях оказывается целесообразным использование жидкофазного синтеза на основе растворимых полимеров;

3) синтез гомо- и гетерополиаминокислот, построенных из повторяющихся остатков одной-двух аминокислот путем полимеризации или сополимеризации производных аминокислот (*N*-карбоксиангидридов и т. п.);

4) ферментативный пептидный синтез, т. е. синтез пептидов с помощью ферментов. Хотя идея такого синтеза весьма привлекательна и многие ферменты способны катализировать образование пептидной связи (реакции, обратной протеолизу), существенных результатов пока этим методом получить не удалось;

5) полусинтез пептидов, заключающийся в использовании методов пептидного синтеза для модификации природных пептидов. Обычным приемом является отщепление в молекуле природного пептида или белка небольшого фрагмента, а затем введение новой аминокислотной последовательности;

6) синтез циклических пептидов, осуществляемый замыканием линейного пептида в цикл соответствующей величины различными способами;

7) синтез гетеродетных пептидов, построенных с участием как амидных связей, так и связей другого типа – сложноэфирных, тиоэфирных, дисульфидных.

Пептидный синтез включает следующие последовательные стадии:

- защита карбоксигруппы аминокомпоненты;
- защита аминогруппы карбоксикомпоненты;
- защита карбокси- и аминогрупп боковых цепей;
- активация карбоксигруппы карбоксикомпоненты;
- синтез, образование пептидной связи;
- удаление (снятие) защитных групп;
- выделение пептида.

ЗАЩИТНЫЕ ГРУППЫ В ПЕПТИДНОМ СИНТЕЗЕ

В пептидном синтезе существуют два типа защитных групп – постоянные и временные. **Постоянными** называют группировки, используемые для защиты боковых функциональных групп и удаляемые на заключительном этапе синтеза пептида. **Временными** являются защитные группы для *N*-концевой аминогруппы и *C*-концевого карбоксила, снимаемые, соответственно, перед каждой стадией удлинения цепи или конденсации фрагментов.

Защитные группы, используемые в синтезе пептидов, должны удовлетворять следующим условиям:

- полностью блокировать соответствующую группировку от участия в проводимых химических реакциях;
- быть устойчивыми в ходе удаления других защитных групп;
- не вызывать побочных реакций и рацемизации при введении, удалении и при образовании пептидных связей;
- защищенные производные должны быть устойчивыми идентифицируемыми соединениями;
- не вызывать осложнений с растворимостью и выделением пептидов из реакционных смесей.

NH₂-защитные группировки. Защитные группы ацильного типа не используются в качестве временных защитных группировок из-за невозможности их удаления без расщепления пептидных связей (например, бензоильная или ацетильная группы) и легко происходящей

рацемизации при получении активированных производных. Формильная и трифторацетильная группы находят применение для защиты *N*-групп лизина. Фталильную и тозилльную группы используют редко из-за жесткости условий их удаления (гидразинолизом и обработкой Na в жидком аммиаке соответственно). Защитные группы алкильного (арильного) типа также используются сравнительно редко. Исключением является *N**ps*-группа, которая легко вводится с помощью соответствующего хлорида, а удаляется с помощью ацидолиза или тиолиза.

Наиболее широко применяются защитные группы уретанового типа. Они вводятся с помощью соответствующих хлоридов, азидов или карбонатов. Удаление их проводится каталитическим гидрогенолизом (в случае серосодержащих пептидов – гидрированием в жидком аммиаке) или так называемым «переносным гидрированием» с использованием в качестве донора 1,4-циклогександиена, циклогексена, муравьиной кислоты или формиата аммония. Часто применяется и ацидолиз в различных условиях (HBr/CH₃COOH, CF₃COOH, 2 н. HCl в диоксане, HF и т. п.).

COOH-защитные группировки. Наиболее широко применяются бензиловые и трет-бутиловые эфиры, реже – метиловые и этиловые эфиры. Бензиловые эфиры и их производные получают прямой этерификацией аминокислот в присутствии кислотных катализаторов или обработкой защищенных производных аминокислот бензилбромидом в щелочной среде. В тех случаях, когда этерификация не может быть использована, применяются специальные реагенты, обычно рекомендуемые для образования сложноэфирных связей, а именно *N*-дициклогексилкарбодиимид (часто в присутствии катализатора 4-иметил-аминопиридина) и *N*-карбонилдиимидазол.

Для блокирования карбоксильных групп в ряде случаев применяют солеобразование, хотя при этом не исключаются побочные реакции в ходе синтеза. Выбор COOH-защитных групп в пептидном синтезе не столь велик и не всегда обеспечивает потребности экспериментатора, особенно в тех случаях, когда синтезируются пептиды, содержащие аспарагиновую и глутаминовую кислоты.

Защитные группировки для функциональных групп боковых цепей аминокислот. В ходе пептидного синтеза обычно оказывается необходимым защищать функциональные группы боковых цепей аминокислотных остатков; в любом случае следует блокировать NH₂-группу лизина и SH-группы цистеина. Блокирование других боковых функциональных групп не всегда строго обязательно.

Существуют два различных тактических подхода к синтезу пептидов: с максимальной защитой боковых функций аминокислот и с минимумом защитных группировок. В первом случае удастся резко ограничить возможность побочных реакций в ходе синтеза, а во втором – существенно облегчить конечное деблокирование защищенного производного пептида. Выбор соответствующего варианта определяется в основном природой синтезируемого пептида. Так как сохранение реакционноспособных функциональных групп в пептиде сокращает методические возможности экспериментатора, в подавляющем числе синтезов защищают боковые группы Ser, Thr, Tyr, Arg, His, Asp, Glu.

МЕТОДЫ СОЗДАНИЯ ПЕПТИДНОЙ СВЯЗИ

Образование пептидной связи в общем сводится к отщеплению элементов воды. Чтобы обеспечить ее высокую скорость и полноту, необходимо «активировать» карбоксильную группу. Такая активация должна сводиться к увеличению электрофильности карбонильного углерода $C^{\delta+}$.

Хлорангидридный метод. В настоящее время применяется редко, так как сопровождается рацемизацией и образованием побочных продуктов. Хлорангидриды получают обычно обработкой и химической модификацией производных аминокислот и пептидов хлористым тиоилом или белков и пептидов пятихлористым фосфором.

Азидный метод. Метод Т. Курциуса широко распространен в синтезе пептидов. Гидразиды получают либо прямым гидразином эфиров защищенных аминокислот или пептидов, либо из защищенных гидразидов ($-CO-NH-NH-Z-$, $-CO-NH-NH-Вос$ и т. д.). Перевод в азиды осуществляется обработкой водным раствором нитрита натрия в кислой среде при $5^{\circ}C$ или действием изоамилнитрита или трет-бутилнитрита при $20^{\circ}C$ в органическом растворителе (модификация Хонцля и Рудингера, 1961 г.). Азиды можно получать и непосредственно из $HOOC$ -производных с помощью дифенилфосфориллазиды $N_3PO(OC_6H_5)_2$, применяемого в качестве конденсирующего агента (в частности, для получения циклопептидов).

Метод смешанных ангидридов. Симметричные ангидриды ацил-аминокислот легко получают обработкой последних дициклогексил-карбодиимидом (ДСС) или этоксиацетиленом.

Более распространенным является метод смешанных ангидридов, который в последнее время широко используется в твердофазном син-

тезе. Быстрый ступенчатый метод синтеза пептидов с использованием избытка смешанных ангидридов носит название РЕМА-синтеза. К этой группе методов можно отнести и синтез пептидов с применением в качестве конденсирующего средства 1-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолина.

Метод активированных эфиров. Среди арильных активированных эфиров наиболее широко используются п-нитрофениловые ($-\text{ONp}$), 2,4-динитрофениловые, о-нитрофениловые и о-нитротифениловые, 2,4,5-трихлорфениловые ($-\text{OTcp}$), пентахлорфениловые ($-\text{OPcp}$). Особое значение приобрели предложенные Л. Кишфалуди высокореакционноспособные пентафторфениловые эфиры ($-\text{OPfp}$). Ариловые эфиры этих типов получают обычно из соответствующих фенолов с помощью карбодиимида.

В последние годы большое распространение получили активированные эфиры на основе производных гидроксилamina, прежде всего *N*-гидроксисукцинимидные эфиры.

Карбодиимидный метод. Дициклогексилкарбодиимид предложен в 1955 г. Дж. Шиэном и Г. Хессом при синтезе пенициллина. Первой стадией реакции является активирование карбоксильного компонента путем образования реакционноспособного производного *O*-ацилизомочевины.

Производное *O*-ацилизомочевины превращается в пептид непосредственно или через соответствующий симметричный ангидрид. Главным побочным процессом является $\text{O} \rightarrow \text{N}$ -ацильный сдвиг, приводящий к получению неактивных побочных продуктов – *N*-ацилизомочевин.

Карбоксиангидридный метод. В 1966 г. Р. Хиршман предложил использовать для направленного синтеза пептидов в водной среде *N*-карбоксиангидриды (NCA, ангидриды Лейкса, оксазолидиндионы). Суть предложенного им приема заключается в точном регулировании pH среды: конденсация *N*-карбоксиангидрида с аминокислотой проводится при pH 10,2, при подкислении осуществляется *N*-декарбоксилирование производных карбаминовой кислоты, затем цикл реакций повторяется (иногда такой прием обозначается как «pH-весы»). Этим методом, в котором построение цепи ведется от *C*- к *N*-концу, Р. Хиршман получил весьма длинные пептидные фрагменты *S*-белка рибонуклеазы. Рацемизация, т. е. полная или частичная потеря оптической чистоты одного или более аминокислотных остатков, является главной побочной реакцией в пептидном синтезе, накладывающей жесткие ограничения на выбор защитных

групп и методов конденсации. Рацемизация приводит к образованию оптически неоднородных продуктов, разделение которых по мере удлинения цепи резко осложняется и превращается в практически не осуществимую задачу.

Синтез на полимерном носителе. Пептидный синтез в классическом варианте сопряжен со значительными затратами труда и времени. С целью создания более эффективной методологии Р. Меррифилд в 1963 г. предложил твердофазный метод синтеза пептидов. Идея его состоит в закреплении растущей полипептидной цепи на полимерном нерастворимом носителе. При этом значительно упрощаются операции выделения промежуточных продуктов, которые сводятся к экстракции и фильтрованию полимера, полностью снимается проблема нерастворимости пептидов и создаются предпосылки для автоматизации процесса. Определяющим фактором в твердофазном синтезе является полнота протекания всех химических реакций, которая достигается за счет применения избытка конденсирующего агента и *N*-защитной аминокислоты, отделяемых экстракцией. Естественно, выбор защитных группировок и методов конденсации должен обеспечить полное отсутствие рацемизации. Наилучшие результаты достигаются при использовании Бое-, Врос- и Fmoc-защитных групп, методов симметричных ангидридов и дициклогексилкарбодиимидного. Успешное проведение синтеза на твердом полимере требует применения высокоочищенных реагентов и растворителей на всех стадиях процесса. Первый твердофазный синтез гормона брадикинина был проведен Р. Меррифилдом с общим выходом 70%. В качестве носителя наиболее широко используется микропористый хлорметилованный сополимер стирола и дивинилбензола, хорошо набухающий в органических растворителях и обладающий химической и механической прочностью.

Полусинтез пептидов и белков. Полусинтез (семисинтез, частичный синтез) – способ получения соединений, заключающийся в комбинировании природных пептидов и белков или их фрагментов с пептидами, полученными полным синтезом или модификацией природных объектов. Полусинтез можно рассматривать как методический прием, основанный на модификации природных соединений. Известные в структурной химии белка способы ферментативного и химического расщепления пептидной цепи и разделение образующихся в результате фрагментов с помощью хроматографической техники позволяют получать гомогенные пептидные блоки. С помощью различных методов можно осуществить целенаправленное изменение нужного

фрагмента (укорочение, удлинение, введение новых остатков и т. п.) и затем собрать из блоков новые, видоизмененные последовательности. Защитные группы при полусинтезе выбираются таким образом, чтобы их введение сохраняло способность производных растворяться в водных и водно-органических растворах. При сборке нужной последовательности из подготовленных пептидных блоков чаще всего используются такие методы, как DCC/HOBt, DCC/HOSu, а также азидный метод и метод активированных эфиров. Особое внимание уделяется при этом проблеме рацемизации.

Синтез циклопептидов. Для получения циклических пептидов используются обычные для пептидного синтеза методы создания амидной связи. Чаще всего первоначально создается линейный предшественник в виде защищенного пептида, активируется С-концевая карбоксильная группа, освобождается N-концевая аминогруппа и проводится реакция аминотерминальной конденсации собственной аминогруппой пептида. Для уменьшения межмолекулярных реакций аминотерминальной конденсации, приводящих к полимеризации и вследствие этого циклоолигомеризации, реакции циклизации проводят в условиях высокого разбавления в инертных растворителях. Однако, как правило, побочные реакции полимеризации всегда имеют место и уменьшают выход циклического продукта. Лучшие результаты дает метод получения циклопептидов на полимерном носителе.

ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ

Задачи химической модификации белково-пептидных веществ, как правило, связаны с выяснением связи между их структурой и биологической функцией. Естественно, при этом могут преследоваться и другие цели, например создание практически важных препаратов с заданными свойствами.

В зависимости от решаемых задач и применяемых методов принято различать следующие типы химической модификации белков и пептидов:

1) замена одного или нескольких аминокислотных остатков на другие и получение на этой основе разнообразных аналогов природных соединений. Такая модификация пептидов достигается методами пептидного синтеза, а белков – посредством так называемого «направленного мутагенеза»;

2) модификация отдельных аминокислотных остатков с помощью селективных химических реагентов. Специфичность реакции определя-

ется природой боковой цепи аминокислотного остатка, пространственным строением модифицируемого соединения и условиями реакции;

3) модификация с помощью бифункциональных реагентов, взаимодействующих одновременно с двумя или более функциональными группами белков;

4) направленная биоспецифическая модификация по «точному адресу», так называемое «аффинное мечение». Широко известно, например, применение субстратоподобных агентов для химического исследования природы и локализации активного центра ферментов или иных систем. Как биоспецифическую модификацию можно рассматривать и некоторые процессы модификации белков, такие как фосфорилирование, ацилирование, гликозилирование, метилирование, протекающие в клетке с участием соответствующих ферментов;

5) введение различных химических меток, репортерных групп, расширяющих возможности физико-химических методов (ЯМР- и ЭПР-спектроскопия, масс-спектрометрия, рентгеноструктурный анализ и др.) при исследовании структуры и функции белков;

6) ковалентное присоединение белка или пептида к полимеру с целью получения так называемых «иммобилизованных» препаратов (например, иммобилизованных ферментов) или создания высокоселективных носителей для биоспецифической (аффинной) хроматографии;

7) топохимическая модификация (трансформация) пептидных систем, используемая при конструировании биологически активных аналогов природных соединений.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ПЕПТИДОВ

В организме человека вырабатывается множество пептидов, участвующих в регуляции различных биологических процессов и обладающих высокой физиологической активностью. Количество аминокислотных остатков в структуре биологически активных пептидов может варьироваться от 3 до 50. К одним из самых «маленьких» пептидов можно отнести тиреотропин-рилизинг-гормон и глутатион (трипептиды), а также энкефалины, имеющие в своем составе пять аминокислот. Однако большинство биологически активных пептидов имеет в своем составе более 10 аминокислот, например нейропептид Y (регулятор аппетита) содержит 36 аминокислот, а кортиколиберин – 41 аминокислоту.

Функции пептидов зависят от их первичной структуры. Изменение в аминокислотном составе пептидов часто приводит к потере одних и возникновению других биологических свойств.

Так как пептиды – мощные регуляторы биологических процессов, их можно использовать как лекарственные препараты. Основное препятствие для терапевтического использования – их быстрое разрушение в организме. Одним из важнейших результатов исследований является не только изучение структуры пептидов, но и получение синтетических аналогов природных пептидов с целенаправленными изменениями в структуре и функциях.

Открытые и изученные в настоящее время пептиды можно разделить на группы по их основному физиологическому действию:

1) обладающие гормональной активностью (окситоцин, вазопрессин, рилизинг-гормоны гипоталамуса, меланоцитстимулирующий гормон, глюкагон и др.);

2) регулирующие процессы пищеварения (гастрин, холецистокинин, вазоинтестинальный пептид, желудочный ингибирующий пептид и др.);

3) регулирующие тонус сосудов и АД (брадикинин, калидин, ангиотензин II);

4) регулирующие аппетит (лептин, нейропептид Y, меланоцитстимулирующий гормон);

5) обладающие обезболивающим действием (энкефалины и эндорфины и другие опиоидные пептиды). Обезболивающий эффект этих пептидов в сотни раз превосходит анальгезирующий эффект морфина;

6) участвующие в регуляции высшей нервной деятельности, в биохимических процессах, связанных с механизмами сна, обучения, памяти, возникновения чувства страха и т. д.

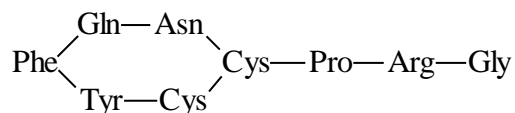
Однако такое деление пептидов крайне условно. Появились данные о том, что многие пептиды обладают широким спектром действия. Так, меланоцит, стимулирующий гормон, помимо стимуляции пигментообразования участвует в регуляции аппетита (вместе с лептином подавляет потребление пищи и является антагонистом нейропептида Y). В то же время эндорфины, кроме анальгетиков, – синергисты.

Примеры биологически активных пептидов.

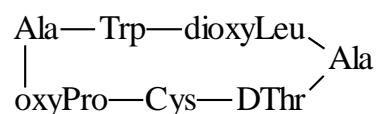
Глутатион – γ-глу-цис-гли – один из наиболее широко распространенных внутриклеточных пептидов, принимает участие в окислительно-восстановительных процессах в клетках и переносе аминокислот через биологические мембраны.

Карнозин – β -ала-гис – пептид, содержащийся в мышцах животных, устраняет продукты перекисного расщепления липидов, ускоряет процесс распада углеводов в мышцах и в виде фосфата вовлекается в энергетический обмен в мышцах.

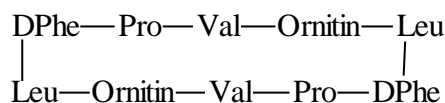
Вазопрессин – гормон задней доли гипофиза, участвующий в регуляции водного обмена организма:



Фаллоидин – ядовитый полипептид мухомора, вызывающий в ничтожных концентрациях гибель организма вследствие выхода ферментов и ионов калия из клеток:



Грамицидин – антибиотик, действующий на многие грамположительные бактерии, изменяет проницаемость биологических мембран для низкомолекулярных соединений и вызывает гибель клеток:



Тема 5. Ферменты

Ферменты (энзимы) – это специфические высокоэффективные белковые катализаторы химических реакций. Большинство клеточных реакций осуществляется с участием ферментов. Обмен веществ в клетках был бы невозможен без резкого ускорения химических реакций, без согласования во времени и пространстве множества биохимических процессов, т. е. без участия ферментов. Одна клетка может содержать до 1000 различных ферментов. В настоящее время известны функции более 2000 ферментов, из которых для нескольких сотен определена аминокислотная последовательность и пространственная структура.

Как и другие химические катализаторы, ферменты:

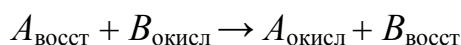
- увеличивают скорость реакции, но не расходуются в процессе и не претерпевают необратимых изменений;
- не смещают равновесие химической реакции, ускоряя как прямую, так и обратную реакцию в равной степени;
- повышают скорость реакции, понижая энергию активации, т. е. тот энергетический барьер, который требуется преодолеть для осуществления реакции.

Ферменты отличаются от химических катализаторов следующими свойствами:

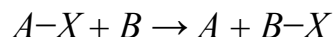
- 1) высокой эффективностью действия – ферментативный катализ ускоряет протекание химических реакций в 10^6 – 10^{14} раз;
- 2) высокой специфичностью действия – способностью связываться с определенным субстратом и катализировать реакцию определенного типа;
- 3) «мягкими» условиями протекания ферментативных реакций – нормальное атмосферное давление, температура 30–40°C, pH ~ 7, водная среда;
- 4) способностью к регуляции своей активности, которая позволяет клеткам четко координировать осуществление многочисленных разветвленных метаболических реакций, обеспечивая наиболее высокий и экономный уровень обмена веществ, а также быструю приспособляемость к меняющимся условиям окружающей среды.

Классификация ферментов. Поскольку для ферментов характерна специфичность действия, их классифицируют по типу реакции, подвергающейся катализу. Согласно принятой в настоящее время классификации, ферменты группируют в шесть классов.

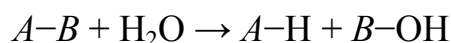
1. Оксидоредуктазы (окислительно-восстановительные реакции):



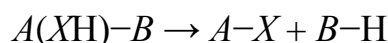
2. Трансферазы (реакции переноса функциональных групп между субстратами):



3. Гидролазы (реакции гидролиза, акцептором переносимой группы является молекула воды):



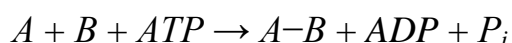
4. Лиазы (реакции отщепления групп от субстрата негидролитическим путем с образованием двойной связи или присоединения групп по двойным связям):



5. Изомеразы (реакции изомеризации):



6. Лигазы или синтетазы (реакции синтеза за счет энергии расщепления нуклеозидтрифосфатов, чаще АТФ):



Номер соответствующего класса фермента закреплен в его кодовой нумерации (шифре). Шифр фермента состоит из 4-х разделенных точками чисел, обозначающих класс фермента, подкласс, подподкласс и порядковый номер в подподклассе.

Систематические названия ферментов образуются путем добавления суффикса **-аза** к названию субстрата, на который действует данный фермент (в случае бимолекулярной реакции – к названиям двух субстратов, разделенных знаком деления), либо к названию типа катализируемой реакции. Например, аргиназа (катализирует гидролиз аргинина), алкогольдегидрогеназа (катализирует окисление этанола). После названия фермента в скобках указывают название органа или организма, из которого был выделен данный фермент. Например, алкогольдегидрогеназа (дрожжи) или алкогольдегидрогеназа (печень крыс).

В некоторых случаях до сих пор сохраняются тривиальные названия ферментов с окончанием **-ин**, не несущие химической информации, например пепсин и трипсин (протеолитические ферменты), каталаза (разрушает перекись водорода) и др.

Систематические названия ферментов используются тогда, когда необходима точная идентификация фермента. Многие систематические названия очень громоздки, и удобнее пользоваться тривиальными названиями. Например, гексокиназа (тривиальное название) – это АТФ: D-гексозо-6-фосфотрансфераза.

Особенности структуры ферментов. Молекулы ферментов характеризуются молекулярными массами от 10 до 1000 кДа и выше, однако большинство ферментов представлено глобулярными белками с молекулярной массой в несколько сотен тысяч Да, построенными из субъединиц – протомеров. Ферменты функционируют обычно в составе мультиферментных систем, катализирующих определенные последовательности реакций (продукт реакции, полученный при участии одного фермента, является субстратом для второго фермента и т. д.). Упаковка субъединиц в мультимерном (состоящем из нескольких субъединиц) белке осуществляется благодаря взаимодействиям того же типа, что и при образовании четвертичной структуры белка. Среди ферментов-мультимеров преобладают димеры и тетрамеры, менее распространены гекса- и октамеры и очень редко встречаются тримеры и пентамеры. Например, дрожжевая синтетаза жирных кислот, катализирующая синтез жирных кислот из низкомолекулярных предшественников, представляет собой систему из семи разных ферментов, молекулы которых объединены в прочно связанный комплекс.

Мультимерные ферментные белки могут содержать протомеры нескольких типов, катализирующих одну и ту же реакцию, но различающихся первичной структурой, молекулярной массой, субстратной специфичностью и др. От соотношения протомеров разного типа в мультимере зависят некоторые его физические и химические свойства. Такие различающиеся формы мультимерного фермента называются **изоферментами** (изозимами).

Изоферменты являются продуктами экспрессии разных генов. В виде нескольких изоферментов существует ряд ферментов, причем они могут встречаться у одного и того же организма и даже внутри одной и той же клетки. Один из основных механизмов образования изоферментов включает объединение разных субъединиц в разной комбинации при образовании активного олигомерного фермента. Например, лактатдегидрогеназа, катализирующая в мышцах обратимую реакцию окисления молочной кислоты, состоит из четырех субъединиц (тетрамер) двух типов (Н и М) и представлена пятью изоферментами – НННН, НННМ, ННММ, НМММ,

ММММ. Они отличаются друг от друга активностью, молекулярной массой, электрофоретической подвижностью, локализацией в органах и тканях, чувствительностью к регуляторным веществам. Существование изоферментов позволяет организму изменять их соотношение и регулировать таким образом метаболическую активность.

Изучение структуры молекул ферментов позволило выявить ряд закономерностей в их организации. Полипептидная цепь, образующая белковую глобулу, свернута довольно сложным образом. Одни участки этой цепи являются α -спиралями или же β -структурами, другие принимают нерегулярные, но вполне определенные конформации. Эти структуры, тесно прилегая друг к другу и чередуясь, упаковываются в блоки, обладающие функциональной активностью. На поверхности белковой глобулы находятся в основном полярные группы и заряженные атомы, причем между противоположно заряженными группами иногда образуются ионные связи. Внутренние области белковой глобулы представляют собой неполярную среду, гидрофобное ядро образовано неполярными группами, входящими, главным образом, в состав алифатических и ароматических боковых цепей аланина, валина, лейцина, изолейцина, метионина, фенилаланина и триптофана. Полярные радикалы аминокислот, имеющие функциональное значение, могут быть также ориентированы внутрь глобулы и ассоциированы друг с другом.

Важнейшей частью фермента является *активный центр*, обычно имеющий форму щели или впадины в глобуле фермента и представляющий собой сложную трехмерную структуру. Одни ферменты имеют один, другие – два или более активных центра. Активные центры ферментов образуются на уровне третичной структуры. В активном центре происходит связывание субстрата и превращение его в продукт. Активный центр почти всегда построен из небольшого количества аминокислотных остатков, которые, как правило, значительно удалены друг от друга в полипептидной цепи. При ее свертывании функциональные группы этих аминокислотных остатков сближаются и формируют активный центр.

В активном центре выделяют два участка – связывающий и каталитический. Остатки аминокислот, образующие *связывающий участок*, отвечают за специфическое комплементарное связывание субстрата и образование фермент-субстратного комплекса, обеспечивая удержание субстрата в активном центре. Именно «архитектура» связывающего участка активного центра фермента определя-

ет его комплементарность структуре субстрата. Формирование фермент-субстратного комплекса происходит без образования ковалентных связей, за счет более слабых сил – водородных и электростатических связей, гидрофобных и вандерваальсовых взаимодействий.

В *каталитический участок* фермента входят остатки аминокислот, непосредственно участвующие в катализе. Их называют каталитическими группами, и они чаще всего представлены функциональными группами остатков серина, гистидина, триптофана, аргинина, цистеина, аспарагиновой и глутаминовой кислот, тирозина. Окончательное формирование каталитического участка у многих ферментов может происходить в момент присоединения субстрата (принцип индуцированного соответствия субстрата и фермента).

Активный центр не может быть очерчен строго определенными границами, поскольку каждый его компонент, так или иначе, взаимодействует с другими участками молекулы фермента. Влияние микроокружения может быть весьма существенным:

- компоненты активного центра, в том числе и кофакторы, взаимодействуют с соседними группами фермента, что изменяет химические характеристики функциональных групп, участвующих в катализе;
- в клетке ферменты образуют структурные комплексы как друг с другом, так и с участками клеточных и внутриклеточных мембран, с элементами цитоскелета и/или другими молекулами, что влияет на реакционную способность функциональных групп в активном центре фермента.

Структура активного центра определяет регио- и стереоспецифичность действия ферментов.

Некоторые ферменты проявляют **полифункциональность** – способность катализировать несколько типов реакций. Это явление объясняется тем, что при формировании третичной структуры полипептидные цепи таких ферментов образуют несколько функционально и стерически обособленных глобулярных участков – *доменов*, каждый из которых характеризуется собственной каталитической активностью.

Специфичность ферментов. Одним из удивительных свойств ферментов является их высокая специфичность. Различают субстратную и реакционную специфичность. Большинство ферментов высокоспецифично как к природе, так и к пути превращения субстрата.

Субстратная специфичность – это способность фермента катализировать превращение определенного субстрата или несколь-

ких субстратов со схожей химической структурой. Эта специфичность у разных ферментов значительно варьируется: одни ферменты могут катализировать реакцию с участием только одного субстрата (абсолютная специфичность), другие взаимодействуют с несколькими химически родственными веществами (групповая специфичность). Например, формамидаза гидролизует только формамид, а амидаза – любой алифатический амид. В этом случае говорят, соответственно, об узкой и широкой субстратной специфичности ферментов.

Субстратная специфичность обусловлена комплементарностью структуры связывающего участка фермента структуре субстрата. Между аминокислотными остатками активного центра фермента и субстратом устанавливается геометрическое (по форме) и химическое соответствие (образование гидрофобных, ионных и водородных связей). Связывание субстрата в активном центре фермента происходит многоточечно, с участием нескольких функциональных групп.

Реакционная специфичность характеризует способность ферментов катализировать реакции определенного типа (например, окислительно-восстановительные). Если субстрат может существовать в нескольких изомерных формах, то одни и те же химические превращения этих изомеров катализируют разные ферменты (например, оксидазы *L*-аминокислот и оксидазы *D*-аминокислот). Исключение составляют изомеразы, которые катализируют взаимопревращения изомеров.

Закономерности ферментативного катализа. Ферментативная реакция – это многостадийный процесс. На 1-й стадии устанавливается индуцированное комплементарное соответствие между ферментом *E* и субстратом *S*. В результате образуется **фермент-субстратный комплекс** *ES*, в котором далее происходит химическое превращение субстрата в продукт(ы). *ES*-комплекс через переходное состояние *ES*^{*} превращается в комплекс фермент-продукт(ы) *EP*, после чего продукт(ы) превращения отделяется от фермента:



При связывании субстрата с ферментом происходит изменение конформации молекул фермента и субстрата, последняя фиксируется в активном центре в напряженной конфигурации. Так формируется активированный комплекс, или **переходное состояние**, – высокоэнергетическая промежуточная структура, которая энергетически

менее устойчива, чем исходные соединения и продукты. Важнейший вклад в суммарный каталитический эффект вносит процесс стабилизации переходного состояния – взаимодействия между аминокислотными остатками белка и субстратом. Разность значений свободной энергии для исходных реагентов и переходного состояния соответствует *свободной энергии активации* ΔG^\ddagger . Это количество энергии, необходимое для перевода всех молекул субстрата в активированное состояние.

Скорость реакции зависит от величины ΔG^\ddagger : чем она меньше, тем больше скорость реакции, и наоборот. По сути, ΔG^\ddagger представляет собой энергетический барьер, который требуется преодолеть для осуществления реакции. Вершина энергетического барьера соответствует переходному состоянию. Стабилизация переходного состояния понижает этот барьер или энергию активации, т. е. ферменты повышают скорость реакций путем снижения активационного барьера и увеличения энергии субстрата при связывании его с ферментом, не влияя при этом на полное изменение свободной энергии.

Можно выделить несколько причин высокой каталитической активности ферментов, которые обеспечивают снижение энергетического барьера реакции:

1) фермент может связывать молекулы реагирующих субстратов таким образом, что их реакционноспособные группы будут располагаться поблизости друг от друга и от каталитических групп фермента (*эффект сближения*);

2) при образовании фермент-субстратного комплекса достигаются фиксация субстрата и его оптимальная для разрыва и образования химических связей ориентация (*эффект ориентации*);

3) связывание субстрата приводит к удалению его гидратной оболочки (существует для растворенных в воде веществ);

4) эффект индуцированного соответствия субстрата и фермента;

5) стабилизация переходного состояния;

6) определенные группы в молекуле фермента (кофермента) могут обеспечивать кислотно-основной катализ (перенос протонов в субстрате) и нуклеофильный катализ (формирование ковалентных связей между ферментом и субстратом, что ведет к образованию более реакционноспособных структур, чем субстрат). Последний характерен для ферментов, катализирующих реакции нуклеофильного замещения.

Кофакторы ферментов. Активность ряда ферментов зависит только от структуры самого белка. Однако во многих случаях (~40%)

для осуществления катализа ферменты нуждаются в особых посредниках – кофакторах. **Кофакторы** – это низкомолекулярные соединения небелковой природы (ионы металлов, сложные органические соединения, в основном производные витаминов), которые функционируют на промежуточных стадиях ферментативной реакции (или цикла реакций), но не расходуются в ходе катализа. В большинстве случаев кофакторы регенерируются в неизменном виде по завершении каталитического акта.

Отделение кофактора от белка, обычно связанного с ним нековалентными связями, приводит к образованию неактивного апофермента. Каталитически активный комплекс апофермент-кофактор называется **холоферментом**.

Различные по химической природе кофакторы делят на две основные группы – коферменты и простетические группы.

Коферменты непрочны (нековалентно) связаны с белком и при катализе отделяются от него (например, НАД⁺, КоА). Восстановление их исходной структуры (регенерация) после участия в катализе может катализироваться уже другим ферментом.

Простетические группы прочно (часто ковалентно) связаны с апоферментом и при катализе не отделяются от него (например, гем в гемопротеинах, атомы металлов в металлопротеинах).

Каждый кофактор имеет определенную структуру, что делает его специфичным для определенного типа реакций. Для участия в реакции кофакторы должны быть связаны с ферментами. При этом комплементарное, точное размещение кофактора в активном центре фермента обеспечивает множество нековалентных контактов с ферментом.

Основные механизмы, согласно которым кофакторы принимают участие в катализе, следующие:

- выполняют функцию переносчиков между ферментами. Взаимодействуя с одним ферментом, переносчик акцептирует часть субстрата, мигрирует к другому ферменту и передает переносимую часть субстрату второго фермента, после чего высвобождается. Такой механизм типичен для большинства коферментов;
- выполняют роль «внутриферментного переносчика», что характерно, в первую очередь, для простетических групп. Простетическая группа присоединяет часть молекулы субстрата и переносит ее на второй субстрат, связанный в активном центре того же фермента. В этом случае простетическую группу рассматривают как часть каталитического участка фермента;

- изменяют конформацию молекулы фермента, взаимодействуя с ней вне активного центра, что может индуцировать переход активного центра в каталитически активную конфигурацию;
- стабилизируют конформацию фермента, способствующую каталитически активному состоянию;
- выполняют функцию матрицы. Например, полимеразы нуклеиновых кислот нуждаются в «программе» – матрице, по которой строится новая молекула;
- играют роль промежуточных соединений. Иногда фермент может использовать в реакции молекулу кофактора, образуя из нее продукт, но при этом одновременно за счет субстрата появляется новая молекула кофактора.

Обычно кофакторы играют роль промежуточных переносчиков электронов, некоторых атомов или функциональных групп, которые в результате ферментативной реакции переносятся с одного соединения на другое. Наиболее распространены кофакторы, осуществляющие перенос восстановительных эквивалентов, фосфатных, ацильных и карбоксильных групп. Ограничимся рассмотрением структуры и механизма функционирования переносчиков восстановительных эквивалентов.

Под **восстановительными эквивалентами** подразумевают обычно атомы H, электроны или гидрид-ионы. Поскольку их перенос осуществляется в ходе окислительно-восстановительных реакций, соответствующие переносчики называют окислительно-восстановительными кофакторами:

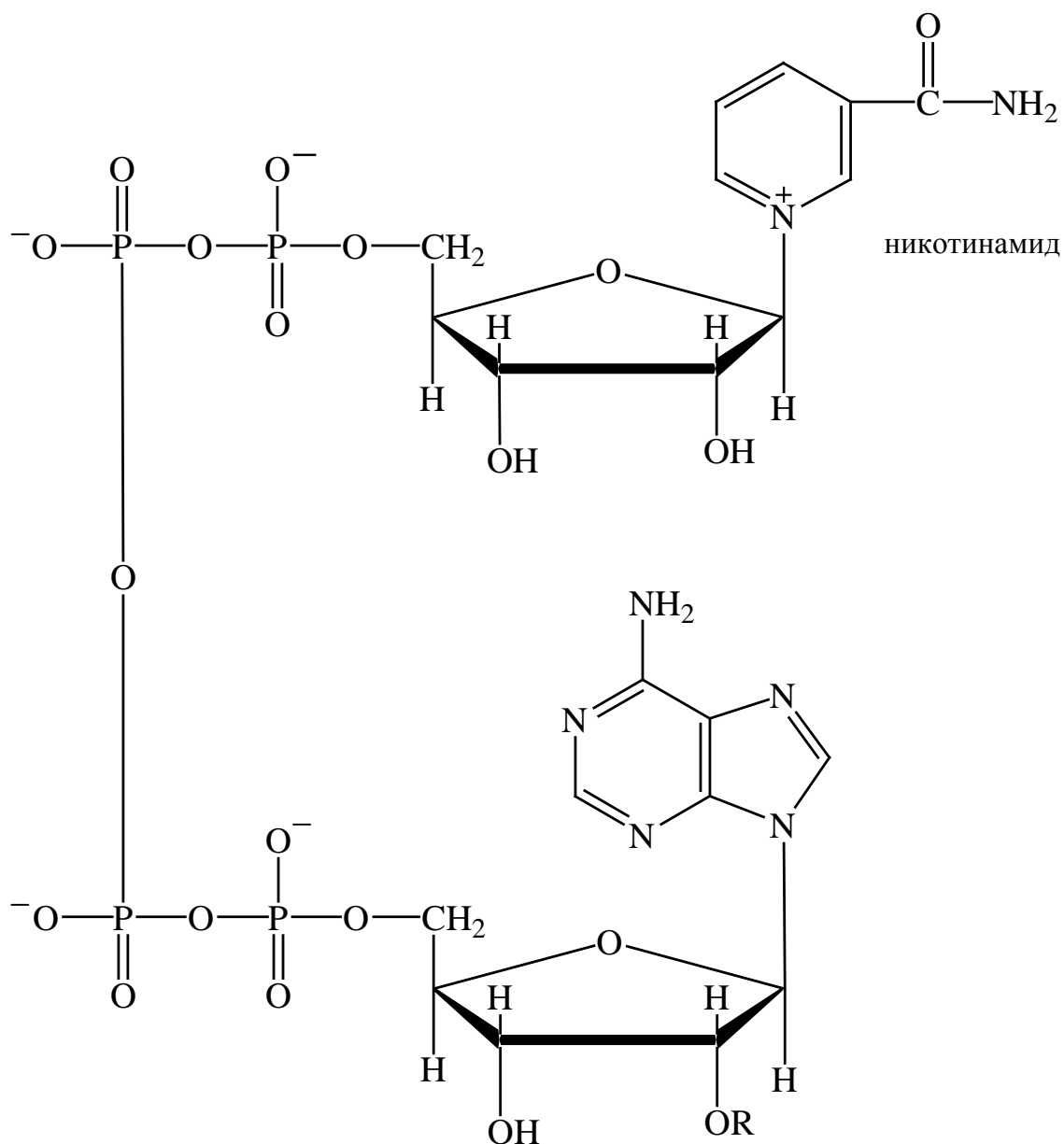


Суммарная реакция: $AN_2 + B \rightleftharpoons A + BH_2$,

где A, B – окисленные субстраты; P – переносчик; AN_2, BH_2 – восстановленные субстраты; E_1, E_2 – ферменты (дегидрогеназы).

К ним относятся никотинамидные и флавиновые переносчики, цитохромы, хиноны, липоевая и аскорбиновая кислоты, глутатион. Наиболее распространены никотинамидные ($НАД^+$ и $НАДФ^+$) и флавиновые ($ФАД$ и $ФМН$) коферменты.

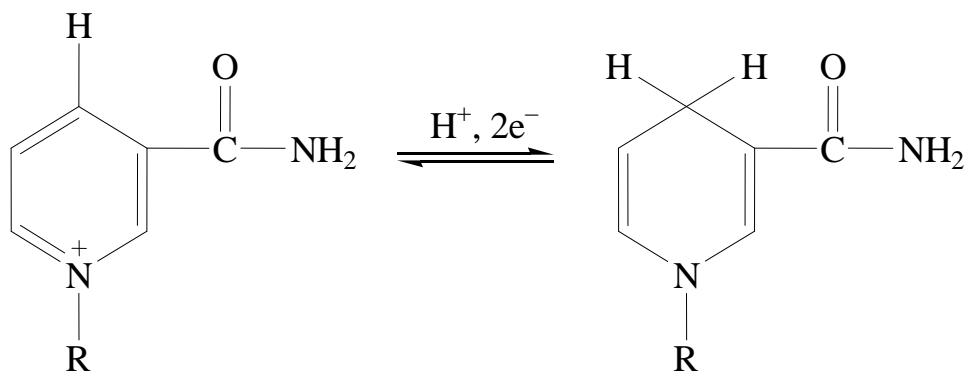
Никотинамидные переносчики восстановительных эквивалентов. Ими являются никотинамидадениндинуклеотид ($НАД^+$, или NAD^+) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат ($НАДФ^+$, или $NADP^+$). Окисленные формы этих коферментов принято обозначать $НАД^+$ и $НАДФ^+$, подчеркивая присутствие избыточного положительного заряда на атоме азота пиридинового кольца.



В молекуле NAD⁺: R=H

В молекуле NADP⁺: R=PO₃²⁻

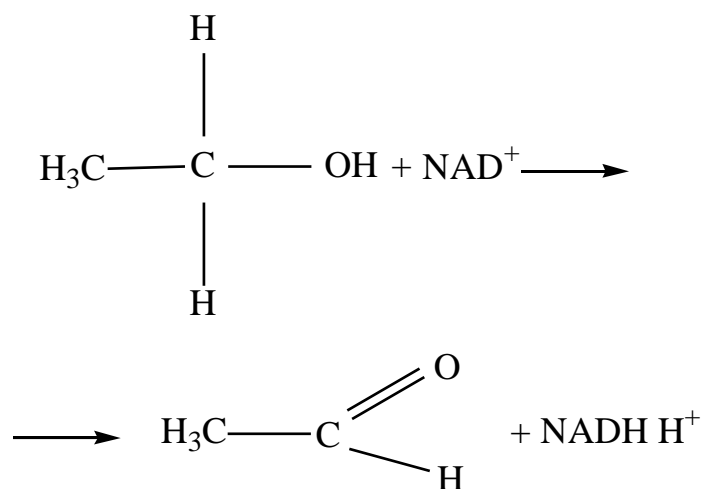
Функциональной группой никотинамидных переносчиков восстановительных эквивалентов служит **пиридиновое кольцо**, входящее в состав никотинамида – витамина В₅ (РР). При ферментативном окислении субстрата с участием НАД⁺ (НАДФ⁺) никотинамид восстанавливается в ходе присоединения гидрид-иона. При этом дегидрирование субстрата в большинстве случаев сопровождается отщеплением двух атомов водорода, в ходе которого протон Н⁺ переносится через раствор.



NAD⁺ (NADP⁺)

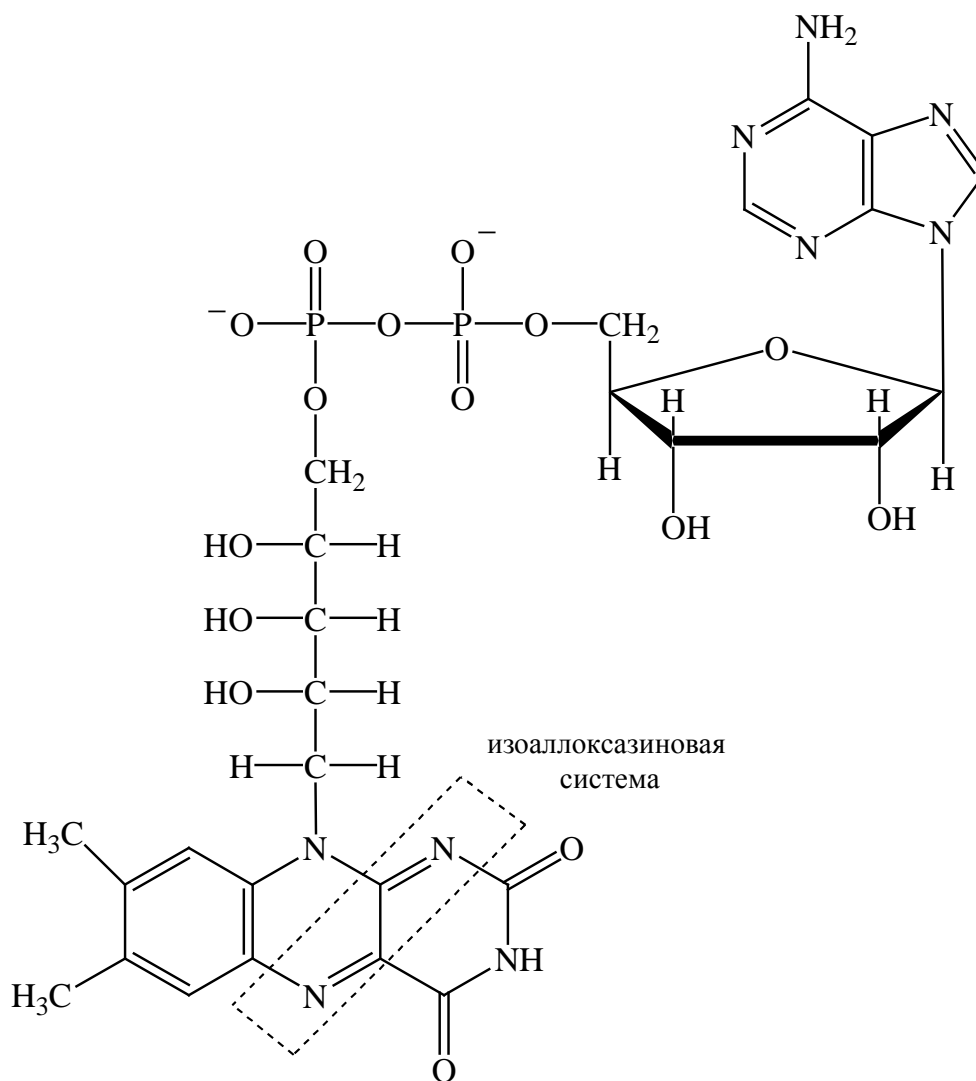
NADH (NADPH)

Примером функционирования никотинамидных переносчиков восстановительных эквивалентов может служить окисление этанола в уксусный альдегид, катализируемое алкогольдегидрогеназой. Этот фермент осуществляет отщепление двух атомов водорода от молекулы этанола, причем к НАД⁺ переносится водород, связанный с углеродом спиртовой группы, а водород, присоединенный к кислороду ОН-группы, высвобождается в среду в виде Н⁺:



Два пиридиновых кофермента участвуют в разных окислительно-восстановительных реакциях при различных окислительно-восстановительных потенциалах: НАД⁺ чаще выступает в роли окислительного агента в катаболических путях, а НАДФ⁺ восстанавливается до НАДФН · Н⁺ и выполняет функцию восстановителя в биосинтетических процессах.

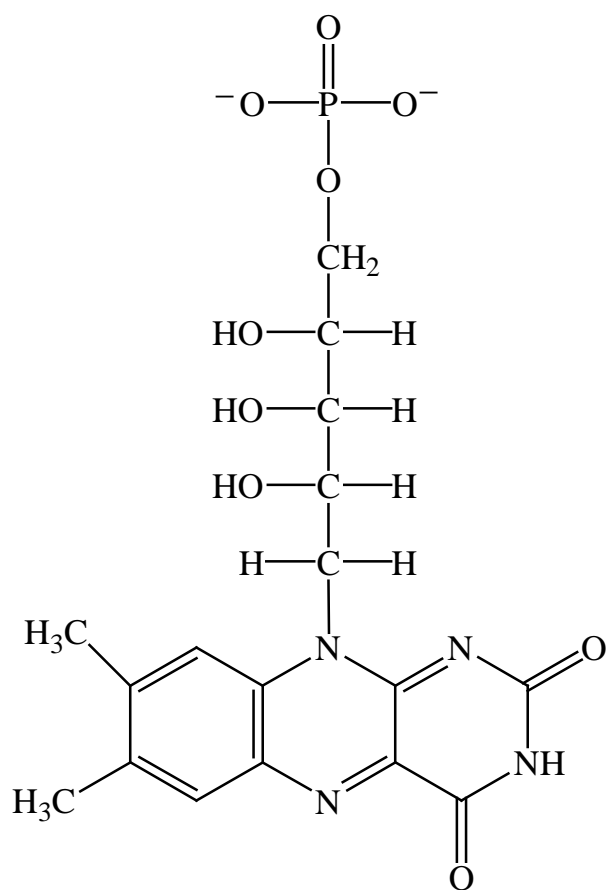
Флавиновые переносчики восстановительных эквивалентов. К ним относятся флавинадениндинуклеотид (ФАД, или FAD) и флавиномононуклеотид (ФМН, или FMN).



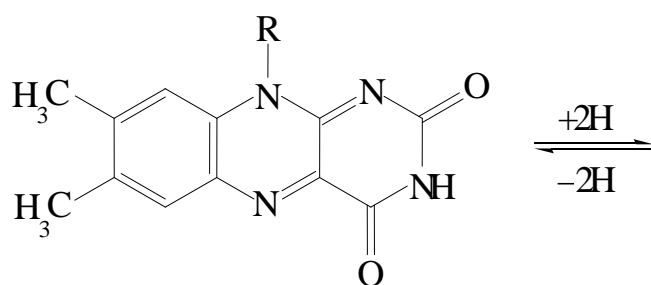
окисленная форма
флавинадениндинуклеотида (FAD)

Флавиновые коферменты являются более сильными окислителями, чем никотинамидные, а восстановленные формы никотинамидных коферментов служат более сильными восстановителями, чем восстановленные флавины.

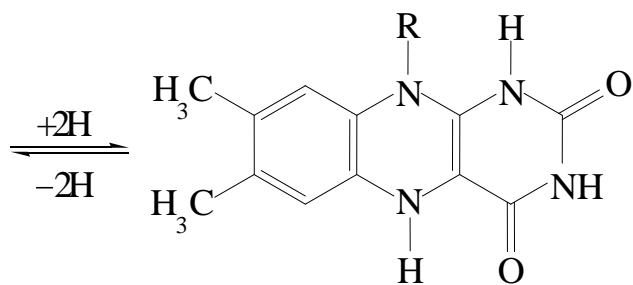
Реакционноспособной частью ФАД и ФМН служит *изоаллоксазиновая система*, содержащая двойные сопряженные связи. Структура этой системы изменяется при восстановлении. Дегидрирование с участием флавиновых кофакторов сопровождается отщеплением от субстрата двух атомов водорода, но в отличие от никотинамидных коферментов, акцептирующих гидрид-ион, флавиновые кофакторы акцептируют оба атома водорода. Поэтому восстановленные формы ФАД и ФМН обозначаются как ФАДН₂ и ФМНН₂.



окисленная форма
флавиномононуклеотида (FMN)



FAD(FMN)



FADH₂(FMNH₂)

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ И ФАКТОРЫ, НА НЕЕ ВЛИЯЮЩИЕ. ПРИНЦИПЫ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ КИНЕТИКИ

Под **активностью фермента** понимают такое его количество, которое катализирует превращение определенного количества субстрата в единицу времени. Для выражения активности препаратов ферментов используют две альтернативные единицы: международную (МЕ) и «катал» (кат). За международную единицу активности фермента принято такое его количество, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в продукт за 1 мин в стандартных условиях (обычно оптимальных). 1 катал обозначает количество фермента, катализирующее превращение 1 моля субстрата за 1 с. $1 \text{ кат} = 6 \cdot 10^7 \text{ МЕ}$. При бимолекулярной реакции $A + B = C + D$ за единицу активности фермента принимают такое его количество, которое катализирует превращение одного мкмоль A или B или двух мкмольей A (если $B = A$) за 1 мин.

Часто ферментные препараты характеризуются удельной активностью, которая отражает степень очистки фермента. **Удельная активность** – это число единиц активности фермента, приходящихся на 1 мг белка.

Молекулярная активность (число оборотов фермента) – число молекул субстрата, подвергающееся превращению одной молекулой фермента за 1 мин при полном насыщении фермента субстратом. Она равна числу единиц активности фермента, деленному на количество фермента, выраженное в мкмольях. Понятие молекулярной активности применимо только для чистых ферментов.

Когда известно количество активных центров в молекуле фермента, вводится понятие **активности каталитического центра**. Характеризуется числом молекул субстрата, которое подвергается превращению за 1 мин в расчете на один активный центр.

Активность ферментов сильно зависит от внешних условий, среди которых первостепенное значение имеют температура и pH среды. Повышение температуры в интервале 0–50°C обычно приводит к плавному увеличению ферментативной активности, что связано с ускорением процессов формирования фермент-субстратного комплекса и всех последующих событий катализа. При повышении температуры на каждые 10°C скорость реакции увеличивается примерно вдвое (правило Вант-Гоффа). Однако дальнейшее повышение температуры (>50°C) сопровождается увеличением количества инактивированного фермента за счет денатурации его белковой части, что выра-

жается в снижении активности. Каждый фермент характеризуется **температурным оптимумом** – значением температуры, при котором регистрируется наибольшая его активность.

Зависимость активности ферментов от значения pH среды имеет сложный характер. Для каждого фермента характерен оптимум pH среды, при котором он проявляет максимальную активность. При удалении от этого значения в ту или другую сторону ферментативная активность снижается. Это объясняется изменением состояния активного центра фермента (уменьшением или увеличением ионизации функциональных групп), а также третичной структуры всей белковой молекулы, которая зависит от соотношения в ней катионных и анионных центров. Большинство ферментов имеют оптимум pH в области нейтральных значений. Однако есть ферменты, проявляющие максимальную активность при pH 1,5 (пепсин) или 9,5 (аргиназа). При работе с ферментами необходимо поддерживать pH с помощью соответствующего буферного раствора. Зависимость ферментативной активности от pH определяется значениями pK ионизированных групп белковой молекулы.

Активность ферментов подвержена значительным колебаниям в зависимости от воздействия **ингибиторов** (веществ, частично или полностью снижающих активность) и **активаторов** (веществ, увеличивающих активность). Их роль выполняют катионы металлов, некоторые анионы, переносчики фосфатных групп, восстановительных эквивалентов, специфические белки, промежуточные и конечные продукты метаболизма.

Принципы ферментативной кинетики. Суть кинетических исследований состоит в определении максимальной скорости ферментативной реакции V_{\max} и константы Михаэлиса K_m . Ферментативная кинетика изучает скорости количественных превращений одних веществ в другие под действием ферментов. Скорость ферментативной реакции измеряют по убыли субстрата или приросту образующегося продукта за единицу времени либо по изменению концентрации одной из смежных форм кофермента.

Влияние концентрации фермента на скорость реакции выражается в следующем: если концентрация субстрата постоянна (при условии избытка субстрата), то скорость реакции пропорциональна концентрации фермента. Для кинетических исследований используют концентрацию фермента 10^{-8} М активных центров.

Оптимальное значение концентрации фермента определяют из графика зависимости активности фермента от его концентрации (рис. 5).

Оптимальным считается значение, лежащее на плато полученного графика в области значений активности фермента, мало зависящих от его концентрации.

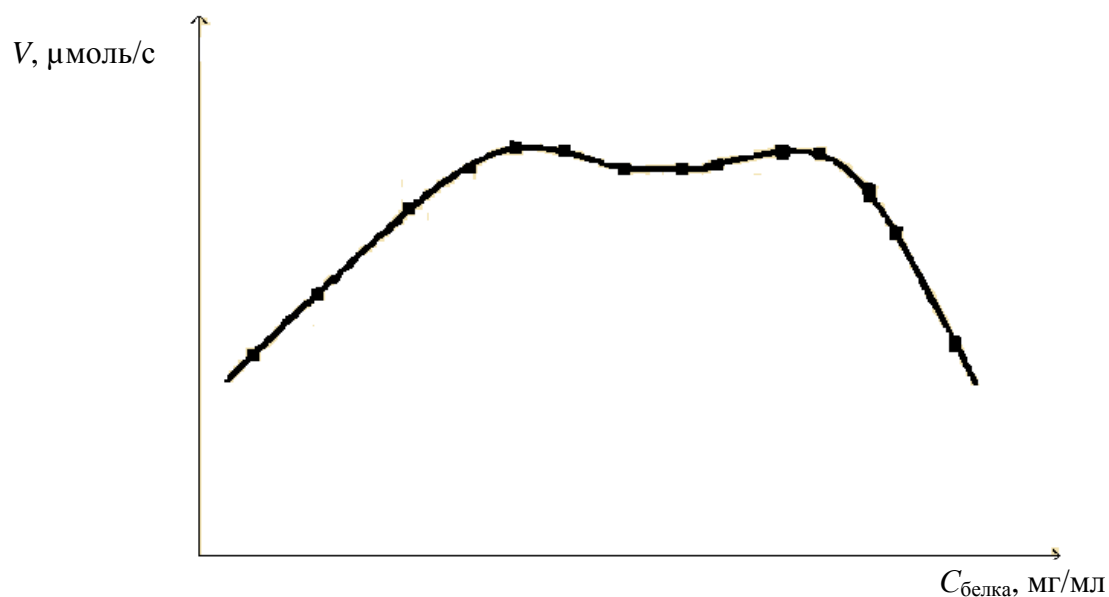


Рис. 5. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации фермента

Для изучения влияния концентрации субстрата на скорость ферментативной реакции сначала строят кинетическую кривую, отражающую изменение концентрации субстрата S_1 или продукта P_1 во времени и измеряют начальную скорость V_1 реакции как тангенс угла наклона касательной к кривой в нулевой точке (рис. 6).

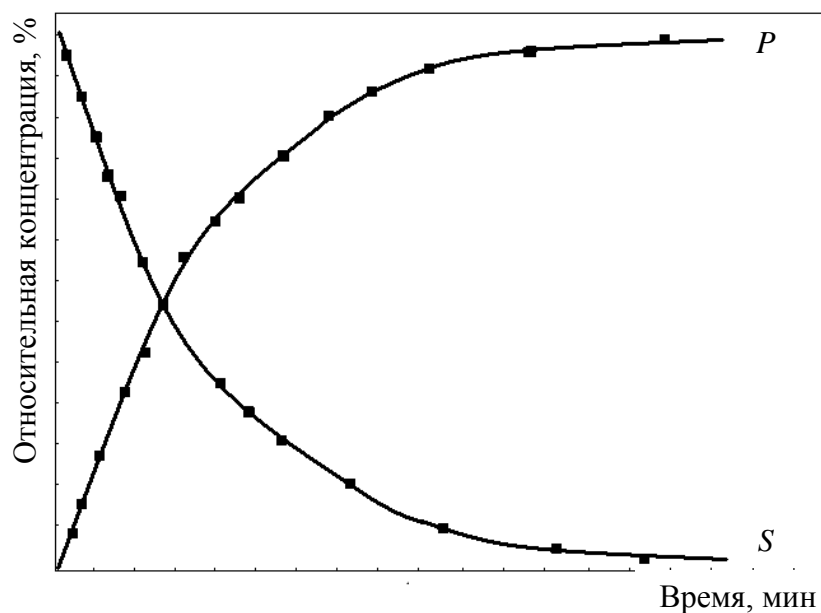


Рис. 6. Кинетические кривые ферментативной реакции

Построив кинетические кривые для других значений концентрации данного субстрата (S_2, S_3, S_4 и т. д.) или продукта (P_2, P_3, P_4 и т. д.) и определив начальные скорости (V_2, V_3, V_4 и т. д.) реакции, строят график зависимости начальной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата (при постоянной концентрации фермента), который имеет вид гиперболы (см. рис. 6).

Кинетика многих ферментативных реакций описывается уравнением Михаэлиса – Ментен. При постоянной концентрации фермента и малых значениях концентрации субстрата $[S]$ начальная скорость реакции прямо пропорциональна $[S]$. В этом случае говорят о полунасыщении фермента субстратом, когда половина молекул фермента находится в форме фермент-субстратного комплекса и скорость реакции $V = 1/2 V_{\max}$. В отношении субстрата реакция имеет 1-й порядок (скорость реакции прямо пропорциональна концентрации одного реагирующего вещества) или 2-й (скорость реакции пропорциональна произведению концентраций двух реагирующих веществ).

При высоких значениях концентрации субстрата $[S]$ скорость реакции почти не зависит от $[S]$ – при дальнейшем увеличении $[S]$ скорость реакции растет все медленнее и в итоге становится постоянной (максимальной). При этом достигается полное насыщение фермента субстратом, когда все молекулы фермента находятся в форме фермент-субстратного комплекса и $V = V_{\max}$. В отношении субстрата реакция имеет 0-й порядок (скорость реакции не зависит от концентрации реагирующих веществ) (рис. 7).

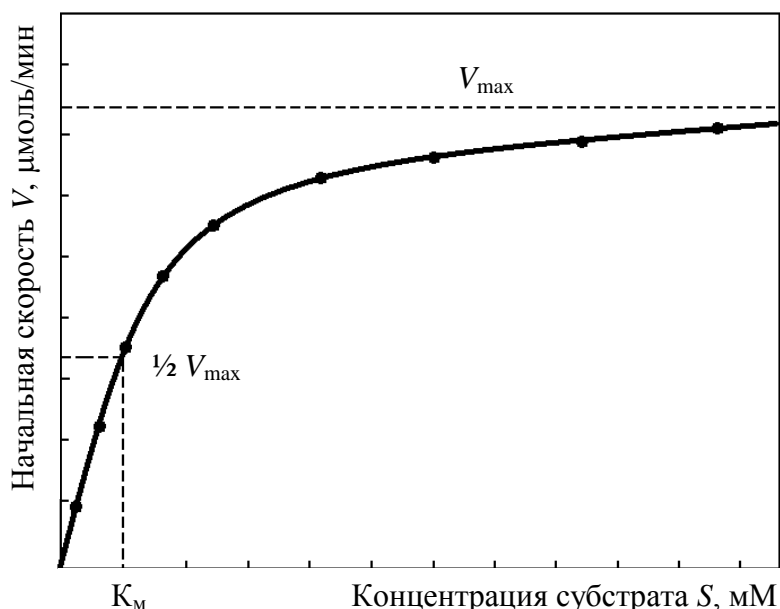


Рис. 7. Зависимость начальной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата

В 1913 г. Л. Михаэлис и М. Ментен предложили простую модель, объясняющую такую кинетику. Согласно этой модели, образование специфического фермент-субстратного комплекса является необходимым промежуточным этапом катализа:



Фермент E соединяется с субстратом S , образуя ES -комплекс. Константа скорости этого процесса k_1 . Судьба ES -комплекса складывается двояко: он может либо диссоциировать на фермент E и субстрат S с константой скорости k_2 , либо подвергнуться дальнейшему превращению, образуя продукт P и свободный фермент E с константой скорости k_3 . При этом постулируется, что продукт реакции не превращается в исходный субстрат. Это условие соблюдается на начальной стадии реакции, пока концентрация продукта невелика.

Скорость катализа определяют в стационарных условиях, когда концентрация промежуточных продуктов остается постоянной, тогда как концентрация исходных веществ и конечных продуктов изменяется. Это имеет место в том случае, когда скорость образования ES -комплекса равна скорости его распада.

Если ввести новую константу K_M – константу Михаэлиса, моль/л, то

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1}.$$

Уравнение Михаэлиса – Ментен, выражающее количественное соотношение между скоростью ферментативной реакции и концентрацией субстрата, имеет вид

$$V = V_{\max} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_M}.$$

Это уравнение соответствует графику зависимости скорости реакции от концентрации субстрата. При низких концентрациях субстрата, когда $[S]$ намного ниже K_M ,

$$V = V_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_M},$$

т. е. скорость реакции прямо пропорциональна концентрации субстрата. При высоких концентрациях субстрата, когда $[S]$ намного выше K_M ,

$$V = V_{\max},$$

т. е. скорость реакции максимальна и не зависит от концентрации субстрата. Если

$$[S] = K_M, \text{ то } V = \frac{V_{\max}}{2}.$$

Таким образом, K_M равна концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину максимальной.

Константа Михаэлиса K_M и максимальная скорость реакции V_{\max} – важные характеристики скорости при разных концентрациях субстрата. V_{\max} – величина постоянная для каждого фермента, которая позволяет оценить эффективность его действия.

Константа Михаэлиса показывает сродство субстрата к ферменту (в случае, когда $k_2 \gg k_3$): чем меньше K_M , тем больше сродство и выше скорость реакции, и наоборот. Каждый субстрат характеризуется своей величиной K_M для данного фермента, и по их значениям можно судить о субстратной специфичности фермента. Константа Михаэлиса зависит от природы субстрата, температуры, pH, ионной силы раствора и наличия ингибиторов.

В связи с тем что определение V_{\max} и K_M непосредственно из графической зависимости Михаэлиса – Ментен является неоднозначным, прибегают к линейаризации данного уравнения. Для этого его преобразуют в такую форму, чтобы графически оно выражалось прямой (рис. 8). Существует несколько методов линейаризации, среди которых наиболее часто применяют методы Лайнуивера – Бэрка и Эди – Хофсти.

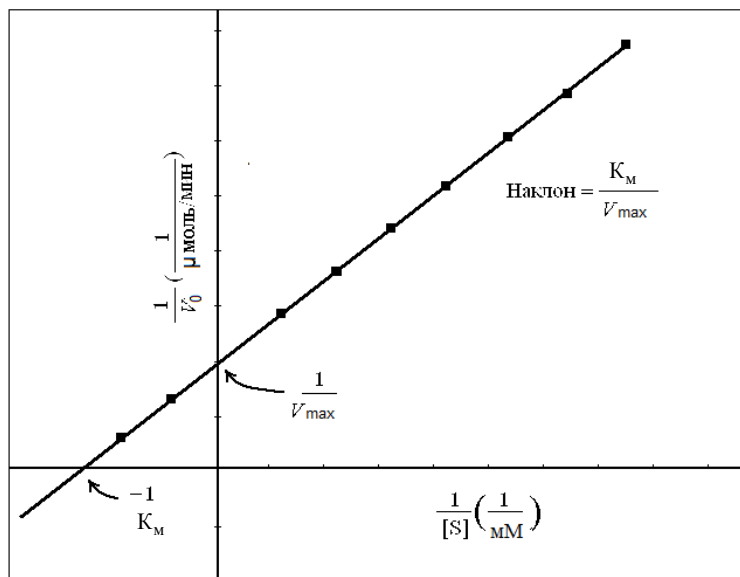


Рис. 8. Метод линейаризации уравнения Михаэлиса – Ментен (по Лайнуиверу – Бэрку)

Преобразование Лайнуивера – Бэрка имеет вид

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]}.$$

Строят график зависимости $1 / V = f(1 / [S])$ и получают прямую линию, пересечение которой с осью ординат дает величину $1 / V_{\max}$; отрезок, отсекаемый прямой на оси абсцисс – величину $-1 / K_M$, а тангенс угла наклона прямой к оси абсцисс равен K_M / V_{\max} . График позволяет более точно определять V_{\max} . Как будет видно ниже, из графика можно также извлечь ценную информацию, касающуюся ингибирования активности фермента.

Метод Эди – Хофсти основан на преобразовании уравнения Михаэлиса – Ментен путем умножения обеих его частей на V_{\max} :

$$V = -K_M \cdot (V/S) + V_{\max}.$$

График в координатах V и $V / [S]$ представляет собой прямую линию, пересечение которой с осью ординат дает величину V_{\max} , а отрезок, отсекаемый прямой на оси абсцисс, – величину V_{\max} / K_M (рис. 9). Он позволяет очень просто определять K_M и V_{\max} , а также выявлять возможные отклонения от линейности, не обнаруживаемые на предыдущем графике.

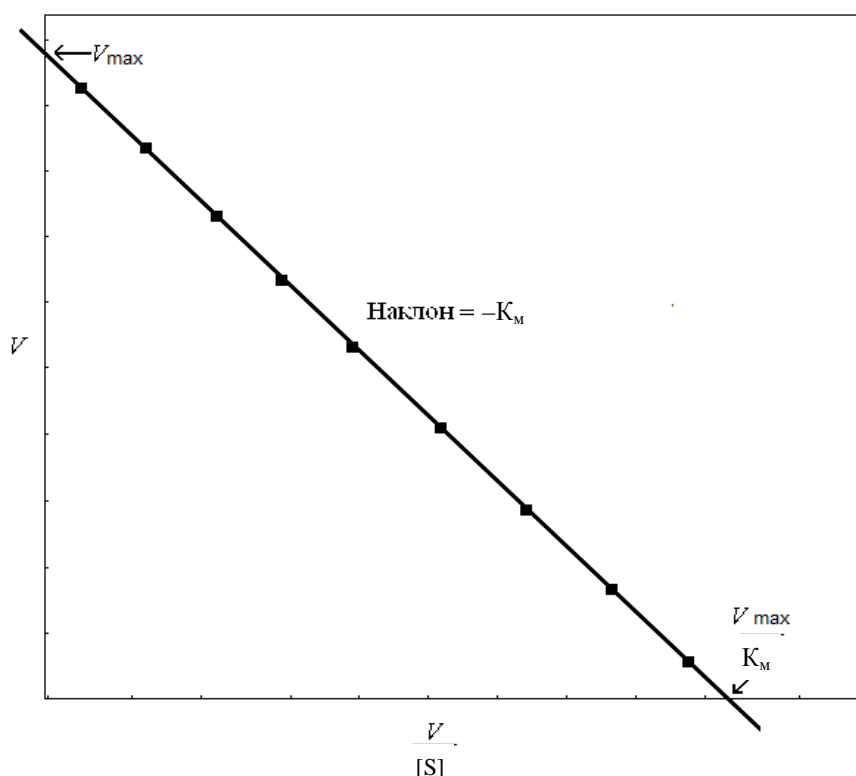


Рис. 9. Метод линеаризации уравнения Михаэлиса – Ментен (по Эди – Хофсти)

Ингибирование активности ферментов. Действие ферментов можно полностью или частично подавить определенными химическими веществами – ингибиторами.

По характеру своего действия ингибиторы подразделяются на обратимые и необратимые. В основе такого деления лежит прочность связывания ингибитора с ферментом.

Обратимые ингибиторы – это соединения, которые нековалентно взаимодействуют с ферментом, при их удалении активность фермента восстанавливается. Обратимое ингибирование может быть конкурентным, неконкурентным и бесконкурентным.

Примером *конкурентного ингибирования* является действие структурных аналогов субстрата, которые могут связываться с активным центром фермента похожим способом, как и субстрат, не превращаясь, однако, в продукт и препятствуя взаимодействию фермента с истинным субстратом, т. е. имеет место конкуренция между субстратом и ингибитором за связывание с активным центром фермента. В результате образования комплексов фермент – ингибитор (EI) концентрация ES -комплексов уменьшается и, как следствие, падает скорость реакции. Иными словами, конкурентный ингибитор уменьшает скорость катализа путем снижения доли молекул фермента, связавших субстрат.

Измерение скоростей реакций при разных концентрациях субстрата позволяет отличать конкурентное ингибирование от неконкурентного. При конкурентном на графике зависимости $1/V = f(1/[S])$ прямые пересекают ось ординат в одной точке $1/V_{\max}$ независимо от присутствия ингибитора, но в присутствии ингибитора увеличивается тангенс угла наклона прямой к оси абсцисс, т. е. V_{\max} не изменяется, а K_m увеличивается, что свидетельствует об уменьшении сродства субстрата к ферменту в присутствии ингибитора.

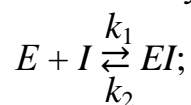
Следовательно, при достаточно высокой концентрации субстрата в условиях конкуренции за активный центр фермента, когда субстрат вытесняет ингибитор из активного центра, ингибирование может быть устранено, и скорость катализируемой реакции восстанавливается.

При этом уравнение Михаэлиса – Ментен имеет вид

$$\frac{1}{V} = \frac{K}{V_{\max}} + \frac{[S]}{V_{\max}} \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) \cdot \frac{1}{[S]},$$

где $[I]$ – концентрация ингибитора; K_i – константа ингибирования.

Константа ингибирования характеризует сродство фермента к ингибитору и представляет собой константу диссоциации EI -комплекса:



$$K_i = \frac{k_2}{k_1} = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]}.$$

При *неконкурентном ингибировании* ингибитор отличается по структуре от субстрата и связывается не с активным, а с аллостерическим центром фермента. Это ведет к изменению конформации активного центра фермента, что сопровождается снижением каталитической активности фермента. Причем ингибитор может связываться не только со свободным ферментом ($E + I \rightarrow EI$), но и с фермент-субстратным комплексом ($ES + I \rightarrow ESI$). Обе формы EI и ESI неактивны. Субстрат и ингибитор могут быть одновременно связаны молекулой фермента, но участки их связывания не перекрываются. Действие неконкурентного ингибитора заключается в уменьшении числа оборотов фермента, а не в снижении доли связавших субстрат молекул фермента. Ингибитор не препятствует образованию ES -комплексов, но тормозит превращение субстрата в продукт.

Максимальная скорость реакции V_{\max}^I в присутствии неконкурентного ингибитора описывается уравнением

$$V_{\max}^I = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}.$$

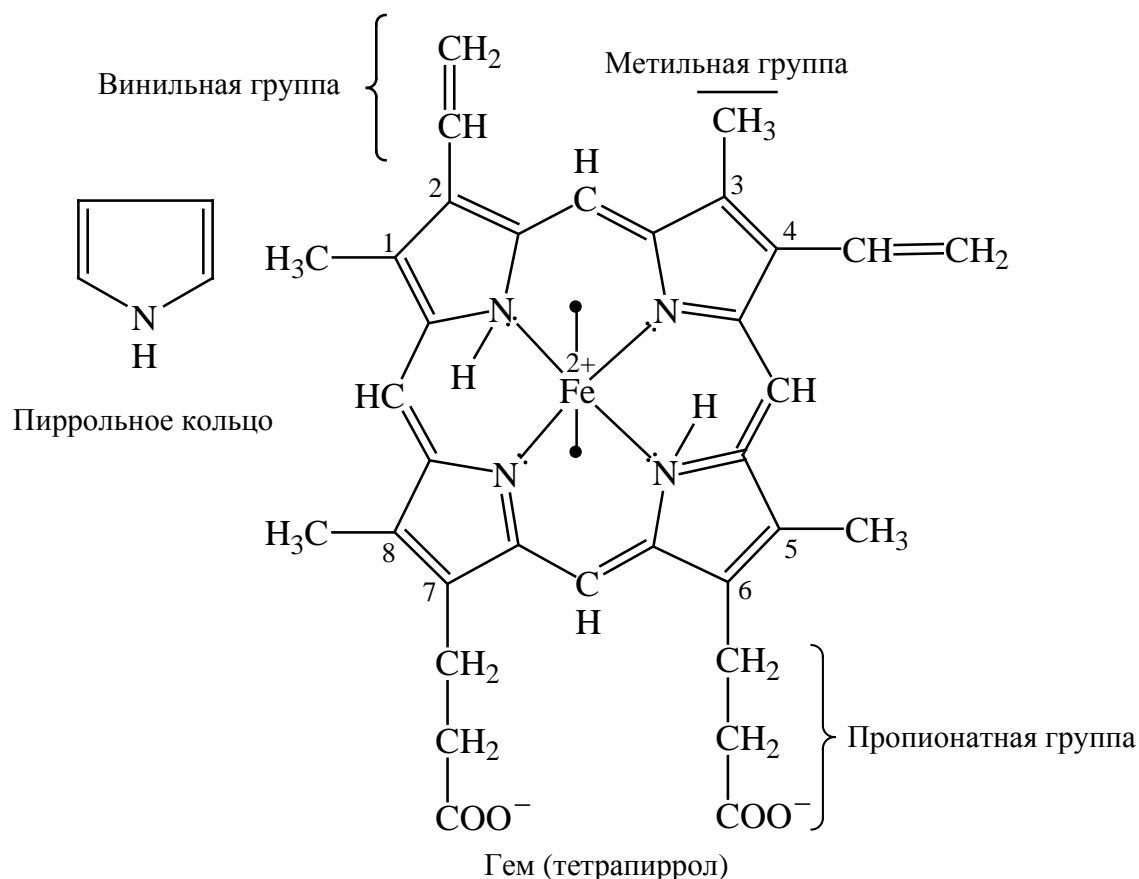
В частном случае *бесконкурентного ингибирования*, когда ингибитор связывается только с ES -комплексом и не связывается со свободным ферментом, на графике зависимости $1/V = f(1/[S])$ прямые параллельны друг другу и пересекают оси ординат и абсцисс в разных точках.

Необратимые ингибиторы – это высокореакционноспособные соединения различной химической природы, которые могут взаимодействовать с функционально важными группами активного центра, образуя прочные ковалентные связи. Это приводит к безвозвратной потере активности фермента. В связи с этим теория Михаэлиса – Ментен, основанная на предположении, что присоединение ингибитора к ферменту носит обратимый характер, в данном случае неприменима.

Примером необратимого ингибирования служит взаимодействие ферментов с ионами тяжелых металлов, которые присоединяются к сульфгидрильным группам цистеиновых остатков фермента и образуют при этом меркаптиды – практически недиссоциирующие соединения, либо ковалентная модификация фермента под действием алкилирующих агентов.

Тема 6. Некоторые биологически важные белки

Гемоглобин представляет собой сложный белок, относящийся к группе гемопroteинов; белковый компонент в нем представлен глобином, небелковый – простетической группой. Простетическая группа в молекуле гемоглобина представлена четырьмя одинаковыми железопорфириновыми соединениями, которые называются **гемами**. Молекула гема состоит из порфирина IX, связанного с железом двумя атомами азота ковалентными связями, а с двумя другими атомами азота координационными. Атом железа (II) расположен в центре гема и придает крови характерный красный цвет, степень его окисления не изменяется независимо от присоединения или отдачи кислорода.



Гемоглобин выполняет две важные функции: перенос O₂ из легких к периферическим тканям; участие в переносе CO₂ и протонов из периферических тканей в легкие для последующего выведения из ор-

ганизма. В состав молекулы входят по две полипептидные цепи двух разных типов, каждая из которых оборачивает один гем гемоглобина. В крови взрослого человека содержится гемоглобин А (HbA), состоящий из $\alpha_2\beta_2$ цепей.

Соединение гемоглобина с кислородом, образующееся в капиллярах легких, называется **оксигемоглобином** (HbO₂). Он имеет ярко-алый цвет. Гемоглобин, отдавший кислород в капиллярах тканей, называется **дезоксигемоглобином**, или восстановленным (Hb). У него темно-вишневая окраска. От 10 до 30% углекислого газа, поступающего из тканей в кровь, соединяется с амидной группировкой гемоглобина. Образуется легкодиссоциирующее соединение карбгемоглобин (HbCO₂). В этом виде часть углекислого газа транспортируется к легким. В некоторых случаях гемоглобин способствует возникновению патологических соединений. При отравлении угарным газом образуется карбоксигемоглобин (HbCO). Сродство гемоглобина с окисью углерода значительно выше, чем с кислородом, а скорость диссоциации карбоксигемоглобина в 200 раз меньше, чем оксигемоглобина. На рис. 10 приведены спектры поглощения различных форм гемоглобина.

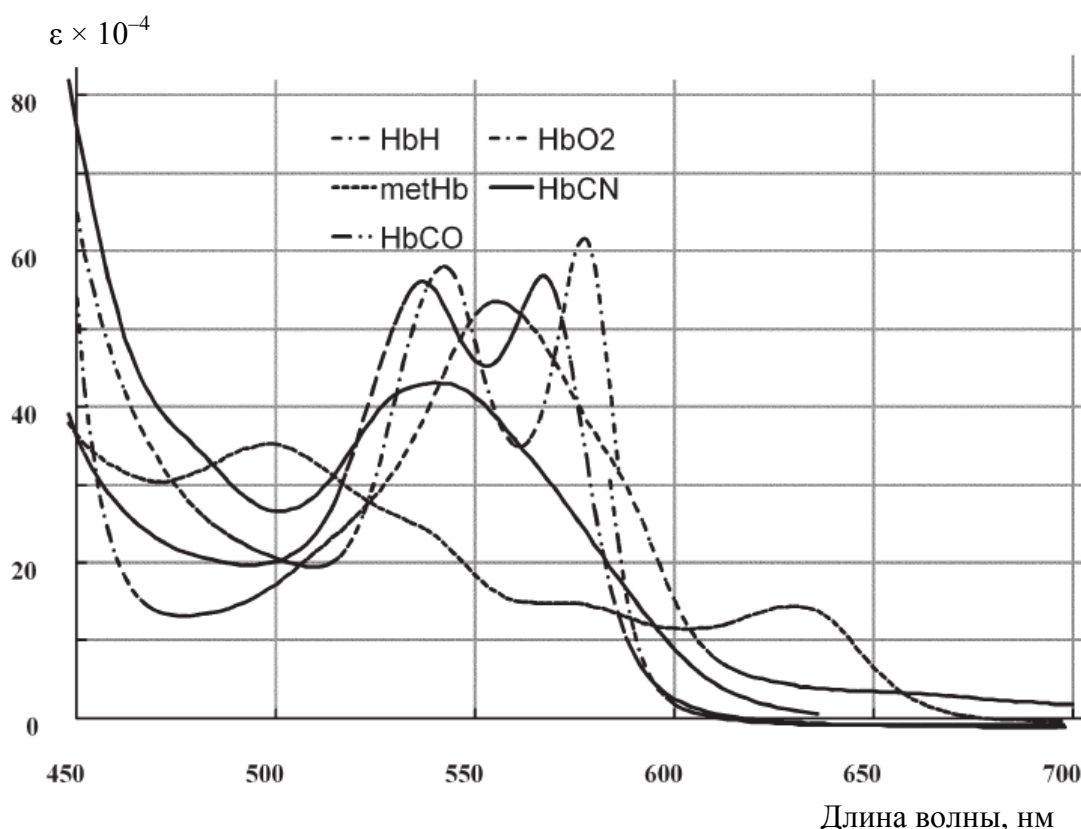


Рис. 10. Спектры поглощения различных форм гемоглобина

Цитохромы (миогематины, гистогематины) – гемопротеиды, биологическая функция которых заключается в переносе электронов и осуществляется (в процессе тканевого дыхания) путем обратимого изменения валентности атомов железа, входящих в состав гема. В зависимости от конфигурации простетической группы цитохромы делятся на четыре типа (каждый из которых, в свою очередь, содержит несколько видов цитохромов): цитохромы *a*, *b*, *c*, *d*.

Цитохром P450 (цитохром P450-зависимая монооксигеназа, англ. *Cytochrome P450*, CYP) – общее название ферментов семейства P450. Входят в класс гемопротеинов, относятся к цитохромам типа *b*. Цитохром P450, связанный с монооксидом углерода, имеет максимум поглощения света при длине волны 450 нм, что определило его название. У эукариотических организмов P450 являются мембранными белками. Система цитохрома P450 участвует в окислении многочисленных соединений, как эндогенных, так и экзогенных. Ферменты этой группы играют важную роль в обмене стероидов, желчных кислот, ненасыщенных жирных кислот, а также в нейтрализации ксенобиотиков (лекарств, ядов, наркотиков). Цитохром P450-зависимые монооксигеназы катализируют расщепление различных веществ с участием донора электрона НАДФН и молекулярного кислорода. В этой реакции один атом кислорода присоединяется к субстрату, а второй восстанавливается до воды.

Ферменты семейства цитохрома P450, в отличие от остальных гемопротеинов, как правило, обладающих одним типом активности и строго определенной функцией, достаточно разнообразны по функциям, типам ферментативной активности, зачастую обладают малой субстратной специфичностью. P450 могут проявлять как монооксигеназную, так и оксигеназную активность, поэтому иногда относятся к оксидазам со смешанной функцией.

Оксигеназные реакции, катализируемые цитохромом P450, весьма разнообразны. Одна из самых распространенных реакций окисления ксенобиотиков – окислительное деалкилирование, сопровождающееся окислением алкильной группы, присоединенной к атомам N, O или S. Другой распространенный тип реакций – гидроксилирование циклических соединений (ароматических, предельных и гетероциклических углеводов). Ферменты семейства P450 могут также катализировать реакции гидроксилирования алифатических соединений, N-окисление, окислительное дезаминирование, реакции восстановления нитросоединений. Механизм функционирования цитохрома P450 представлен на рис. 11.

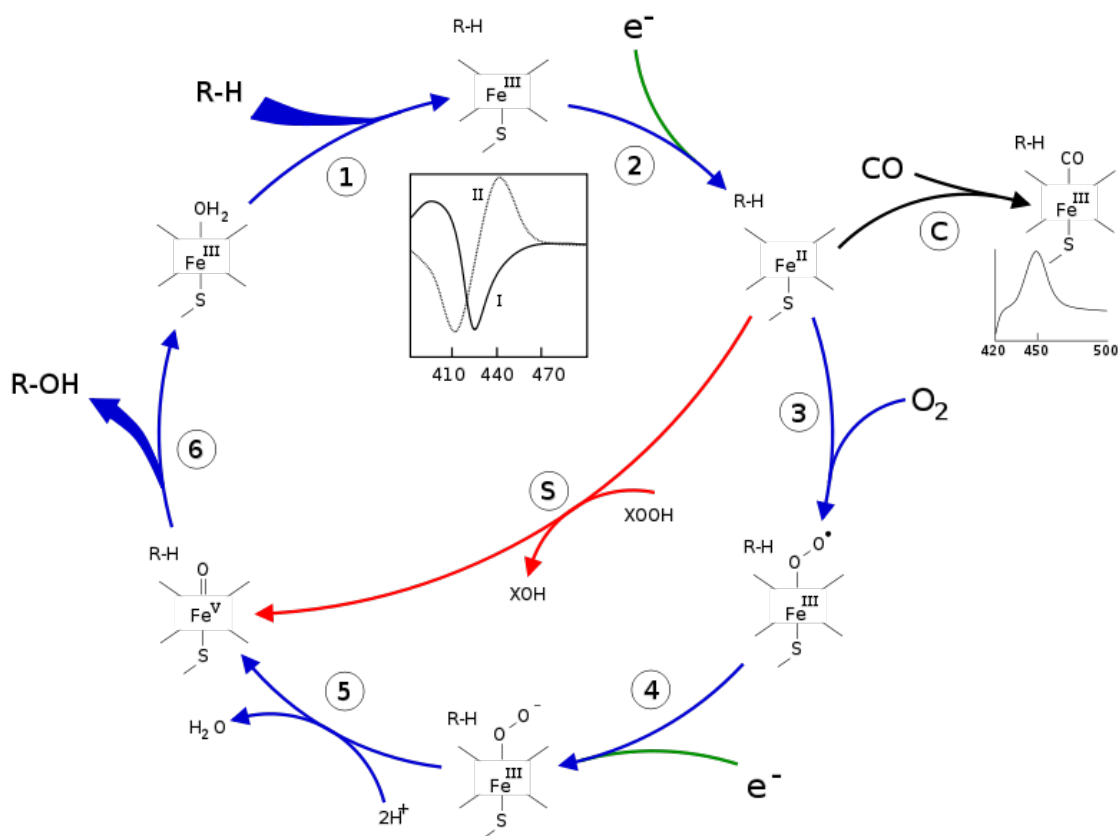


Рис. 11. Механизм функционирования цитохрома P450

Цитохромы P450 катализируют омега-окисление насыщенных жирных кислот, перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот, гидроксилирование стероидных гормонов, желчных кислот и холестерина, биосинтез простагландинов.

Цитохромы P450 печени человека участвуют в нейтрализации ксенобиотиков (лекарств, ядов, наркотических веществ). Их субстратная специфичность невелика. Они наиболее эффективно катализируют окисление неполярных соединений с алифатическими или ароматическими кольцами. P450 печени, помимо прочего, участвует в окислении спиртов до соответствующих альдегидов. В связи с этим изучение ферментативной системы P450 имеет большое значение для фармакологии.

Защитные белки – название в известной мере условное. В эту группу включены некоторые наиболее изученные белковые вещества, участвующие в проявлении защитных реакций организма. Основу их составляют белки иммунной системы (иммуноглобулины, антигены тканевой совместимости, интерлейкины, интерфероны и т. п.). В эту же группу могут быть включены и белки, вызывающие свертывание крови (фибриноген, фибрин, тромбин).

Иммунитет – это врожденная, наследуемая способность организма распознавать и обезвреживать чужеродный материал, поступивший извне или образовавшийся в результате патологического процесса. Иммунная система человека и животных (позвоночных) высокоспециализирована и достаточно сложна. По своей значимости она сравнима с нервной системой. Основными органами иммунной системы человека являются костный мозг, лимфатические узлы, селезенка и тимус (зобная железа), которые связаны в функционально единое целое системами лимфо- и кровообращения. Общий вес клеток иммунной системы человека около 1 кг.

Иммуноглобулины Ig – это растворимые гликопротеины, присутствующие в сыворотке крови, тканевой жидкости или на клеточной мембране, которые распознают и связывают антигены. Иммуноглобулины синтезируются В-лимфоцитами (плазматическими клетками) в ответ на чужеродные вещества определенной структуры – антигены. Антитела используются иммунной системой для идентификации и нейтрализации чужеродных объектов, например бактерий и вирусов. Антитела выполняют две функции: антиген-связывающую и эффекторную (например, запуск классической схемы активации комплемента и связывание с клетками); являются важнейшим фактором специфического гуморального иммунитета; состоят из двух легких и двух тяжелых цепей. У млекопитающих выделяют пять классов иммуноглобулинов – IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, различающихся между собой по строению и аминокислотному составу тяжелых цепей.

Антитела являются относительно крупными (~150 кДа – IgG) гликопротеинами, имеющими сложное строение. Состоят из двух идентичных тяжелых цепей и из двух идентичных легких цепей. К тяжелым ковалентно присоединены олигосахариды. В зависимости от класса и выполняемых функций антитела могут существовать как в мономерной (IgG, IgD, IgE, сывороточный IgA), так и в олигомерной формах (димер-секреторный IgA, пентамер IgM). Всего различают пять типов тяжелых цепей (α -, γ -, δ -, ϵ - и μ -цепи) и два типа легких цепей (κ -цепь и λ -цепь).

Классификация по тяжелым цепям. Существует пять классов (изотипов) иммуноглобулинов, различающихся:

- величиной;
- зарядом;
- последовательностью аминокислот;
- содержанием углеводных компонентов.

Иммуноглобулины всех изотипов бифункциональны. Это означает, что иммуноглобулин любого типа распознает и связывает антиген, а затем усиливает киллинг и/или удаление иммунных комплексов, сформированных в результате активации эффекторных механизмов.

IgG является основным иммуноглобулином сыворотки здорового человека (составляет 70–75% всей фракции иммуноглобулинов), наиболее активен во вторичном иммунном ответе и антитоксическом иммунитете. Благодаря малым размерам (коэффициент седиментации 7S, молекулярная масса 146 кДа) является единственной фракцией иммуноглобулинов, способной к транспорту через плацентарный барьер, обеспечивая тем самым иммунитет плода и новорожденного.

IgM представляет собой пентамер основной четырехцепочечной единицы, содержащей две μ -цепи. При этом каждый пентамер содержит одну копию полипептида с J -цепью (20 кДа), который синтезируется антителообразующей клеткой и ковалентно связывается между двумя соседними FC-фрагментами иммуноглобулина. Появляются при первичном иммунном ответе B -лимфоцитами на неизвестный антиген, составляют до 10% фракции иммуноглобулинов. Являются наиболее крупными иммуноглобулинами (970 кДа). Содержат 10–12% углеводов. Образование IgM происходит еще в пре- B -лимфоцитах, в которых первично синтезируются из μ -цепи; синтез легких цепей в пре- B -клетках обеспечивает их связывание с μ -цепями, в результате образуются функционально активные IgM, которые встраиваются в поверхностные структуры плазматической мембраны, выполняя роль антиген распознающего рецептора; с этого момента клетки пре- B -лимфоцитов становятся зрелыми и способны участвовать в иммунном ответе.

IgA. Сывороточный IgA составляет 15–20% всей фракции иммуноглобулинов, при этом 80% молекул IgA представлено в мономерной форме у человека. Секреторный IgA представлен в димерной форме в комплексе с секреторным компонентом, содержится в серозно-слизистых секретах (например, в слюне, слезах, молозиве, молоке, отделяемом слизистой оболочки мочеполовой и респираторной систем). Содержит 10–12% углеводов, молекулярная масса 500 кДа.

IgD составляет менее 1% фракции иммуноглобулинов плазмы, содержится в основном на мембране некоторых B -лимфоцитов. Функции до конца не выяснены, предположительно является антигенным рецептором с высоким содержанием связанных с белком углеводов для B -лимфоцитов, еще не представлявших антигену. Молекулярная масса 175 кДа.

IgE в свободном виде в плазме почти отсутствует. Способен осуществлять защитную функцию в организме при действии паразитарных инфекций, обуславливает многие аллергические реакции. Механизм действия IgE проявляется через связывание с высоким сродством с поверхностными структурами базофилов и тучных клеток с последующим присоединением к ним антигена, вызывая дегрануляцию и выброс в кровь высокоактивных аминов (гистамина и серотонина – медиаторов воспаления).

Белки мышц и соединительных тканей. Волокна коллагена очень прочны, они входят в состав сухожилий, кожи, хрящей, кровеносных сосудов. Коллаген, составляющий около одной трети всех белков позвоночных, относится к фибриллярным белкам, образующим длинные нити – фибриллы. К таким белкам принадлежат также α -кератины волос и шерсти, фиброин шелка; основой их служат сплетенные вместе α -спиральные пептидные цепи. Коллагеновые нити образуются путем плотной укладки (четырьмя уступами) молекул тропоколлагена. **Тропоколлаген** – основная структурная единица коллагена, имеет молекулярную массу 285 000 и состоит из трех полипептидных цепей. Эти цепи находятся в особой, присущей лишь коллагену, конформации и образуют тройную спираль. Прочность коллагеновых волокон (нить сечением около 1 мм выдерживает нагрузку более 10 кг) во многом достигается за счет дополнительных ковалентных «сшивок» между молекулами тропоколлагена. Близким аналогом коллагена является **эластин** – белок эластичных волокон, содержащийся в стенках кровеносных сосудов, в связках, в тканях шеи у гусей и лебедей. Характерное свойство эластина – его способность растягиваться в несколько раз. В структурном отношении он аналогичен коллагену, однако имеет мало остатков HyPro и совсем не содержит остатков HyLys .

Гормоны – это биологически активные регуляторы эндогенного происхождения, т. е. синтезируемые в организме, а не вносимые в него извне. Гормоны разносятся по организму кровью и действуют на клетки-мишени, удаленные от эндокринных органов. К белковым гормонам относятся такие важнейшие соединения, как инсулин, гормон роста (соматотропин), некоторые гормоны гипофиза – центральной железы внутренней секреции: тиротропин, гонадотропин, лютропин, липотропин. Еще один белковый гормон – паратгормон – синтезируется в паращитовидных железах.

Инсулин синтезируется в β -клетках поджелудочной железы, образующих так называемые островки Лангерганса. Первоначально он об-

разуется в форме **прегормона** – одноцепочечного белка, состоящего из 109 остатков аминокислот. При отщеплении 23-членного сигнального пептида получается проинсулин, быстро расщепляемый специфическими ферментами, в результате чего образуется молекула инсулина, состоящая из двух полипептидных цепей, соединенных двумя дисульфидными связями. Цепь *A* содержит 21, а цепь *B* – 30 аминокислотных остатков. Инсулин стал первым белком, у которого была расшифрована полная первичная структура. Инсулин – также первый белок, полученный с помощью химического синтеза. В ходе получения инсулина были синтезированы отдельно две его цепи, а затем проведено замыкание дисульфидных мостиков.

Соматотропин (СТГ, гормон роста) – белковый гормон, вырабатываемый передней долей гипофиза, секреция которого регулируется факторами гипоталамуса. Соматостатин ингибирует секрецию СТГ, а стимулирует ее пока не идентифицированный рилизинг-фактор гипоталамуса. Соматотропин относится к группе анаболических гормонов. При введении его в организм животного с гипофизарной недостаточностью наблюдается усиление роста скелетных костей и других тканей, усиливается синтез белка и секреция молока.

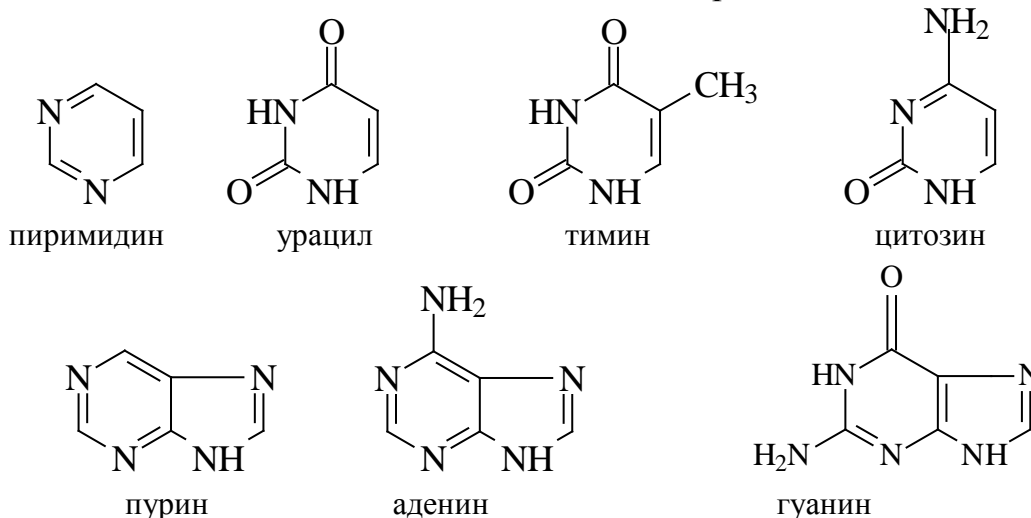
Пролактин. В аденогипофизе образуется еще один белковый гормон, близкий по химическим и биологическим свойствам соматотропину, – пролактин, или лактогенный гормон. Он значительно эффективнее, чем соматотропин, стимулирует лактацию и, помимо этого, обладает широким спектром биологического действия. Пролактин влияет на рост органов и тканей животных, регулирует водный и солевой баланс, стимулирует развитие вторичных половых признаков. Секреция пролактина находится под контролем гипоталамических факторов, в частности, пока не охарактеризованного химически пролактин-рилизингингибирующего фактора. Секрецию пролактина стимулируют тиролиберин и другие факторы. Молекула пролактина (овцы) состоит из 198 аминокислот и содержит три дисульфидных мостика.

Тема 7. Структура нуклеиновых кислот

Нуклеиновые кислоты – высокомолекулярные гетерополимеры, играющие основную роль в сохранении и реализации генетической информации. Различают два типа нуклеиновых кислот (НК): *дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК)*, которые обеспечивают сохранение информации, и *рибонуклеиновые кислоты (РНК)*, принимающие участие в процессах генной экспрессии и биосинтеза белка. Нуклеиновые кислоты построены из нуклеотидных звеньев, которые, в свою очередь, состоят из азотистого основания, углеводного остатка и фосфатной группы.

При мягком щелочном гидролизе нуклеиновые кислоты распадаются на мономеры – **нуклеотиды**. Нуклеотиды при нагревании до 145°C с водным аммиаком теряют остаток фосфорной кислоты с образованием нуклеозидов, которые в условиях кислотного гидролиза распадаются на азотистые основания и сахара.

Азотистые основания – это ароматические гетероциклические соединения, производные пиримидина или пурина. Пять азотистых оснований являются основными структурными компонентами нуклеиновых кислот, общими для всей живой материи.



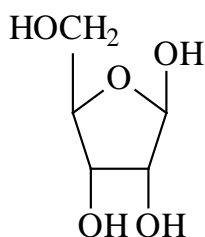
В состав ДНК входят **аденин, гуанин, тимин и цитозин**. В состав РНК – **аденин, гуанин, урацил и цитозин**. Кроме перечисленных, в нуклеиновых кислотах в небольших количествах встречаются модифицированные азотистые основания, в основном метилированные и гидроксильные, их называют *минорными*.

Для пуриновых и пиримидиновых оснований характерны лактам-лактимная и амин-иминная таутомерия. По данным ИК- и ЯМР-

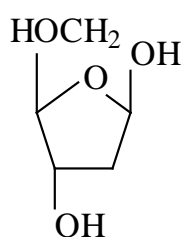
спектроскопии выявлено, что в нуклеиновых кислотах пуриновые и пиримидиновые основания преимущественно находятся в лактамной и аминной формах, это обеспечивает правильность спаривания.

Азотистые основания поглощают свет в УФ-области спектра с максимумом 260 нм, что используется для количественного определения НК.

Углеводная часть нуклеотидов, входящих в РНК, представлена рибозой, а входящих в ДНК, – дезоксирибозой. Пентозы в нуклеиновых кислотах всегда присутствуют в β -D-фуранозной форме. Углеродные атомы пентоз в нуклеотидах нумеруют со знаком «штрих», чтобы их можно было отличить от атомов азотистых оснований.



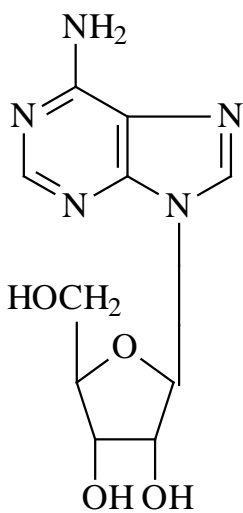
рибоза



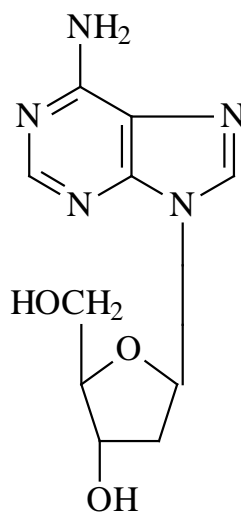
дезоксирибоза

Соединения азотистых оснований с пентозой с помощью N-гликозидных связей называют нуклеозидами: рибонуклеозидами (аденозин, гуанозин, цитидин и уридин) и дезоксирибонуклеозидами (дезоксиаденозин, дезоксигуанозин, дезоксицитидин и тимидин).

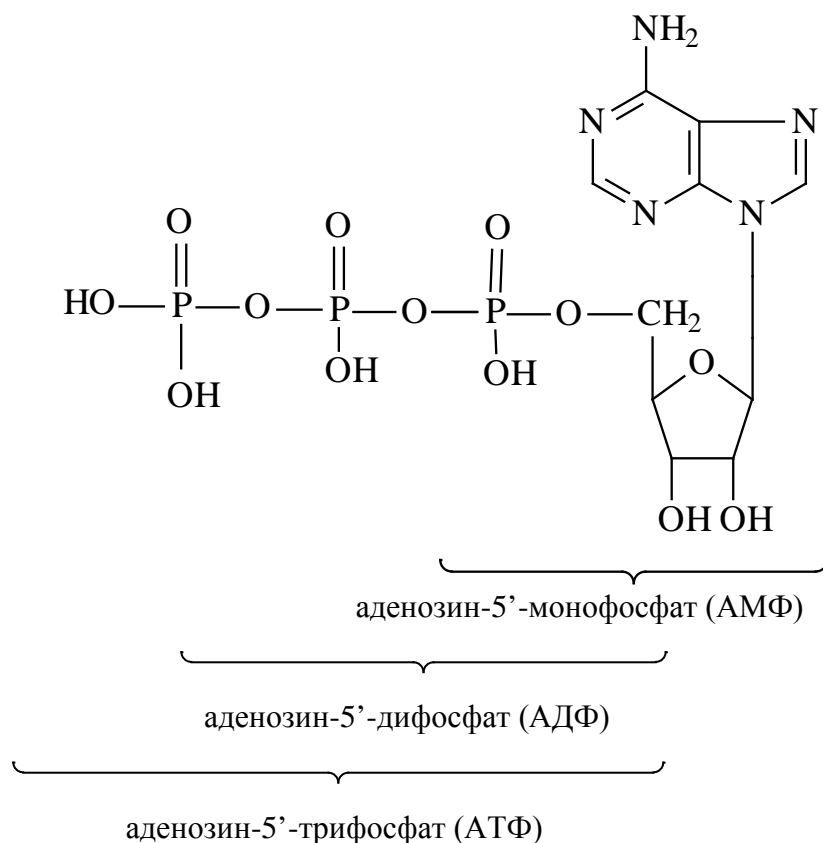
Нуклеозиды, этерифицированные фосфорной кислотой по 5'-положению, называются **нуклеотидами**. В случае одного остатка фосфорной кислоты они называются нуклеотид**моно**фосфатами, в случае двух остатков – нуклеотид**ди**фосфатами, в случае трех – нуклеотид**три**фосфатами.



аденозин



дезоксиаденозин



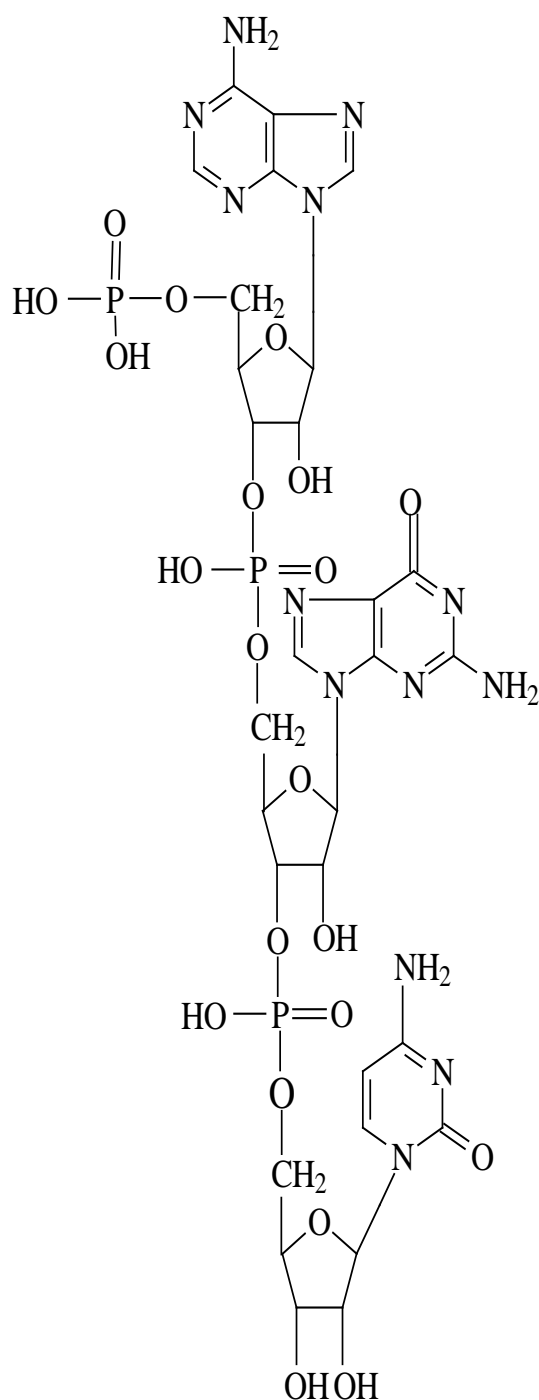
В молекулах нуклеотидтрифосфатов остатки фосфорной кислоты соединены ангидридной связью, обладающей большой потенциальной энергией. Такие связи называются *макроэргическими*, а соединения – *высокоэнергетическими*. АТФ занимает центральную роль в обмене веществ и энергии во всех клетках, ГТФ энергетически обеспечивает процессы трансляции белков, УТФ необходим для синтеза гликогена, ЦТФ участвует в синтезе глицерофосфолипидов.

Нуклеиновые кислоты – это неразветвленные полимеры нуклеотидов, соединенных между собой 3',5'-фосфодиэфирной связью. Полинуклеотиды, составленные из рибонуклеотидных звеньев, называются *рибонуклеиновыми кислотами* (РНК), из дезоксирибонуклеотидных звеньев – *дезоксирибонуклеиновыми кислотами* (ДНК).

Ионизированные фосфатные группы полимерного остова сообщают молекулам нуклеиновых кислот большой отрицательный заряд. По этой причине в клетках ДНК обычно присутствуют в комплексе:

- 1) с основными белками – гистонами и протаминами;
- 2) поликатионами типа спермидина $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$;
- 3) щелочноземельными катионами – Mg^{2+} .

Пример нуклеотида, построенного по типу РНК:



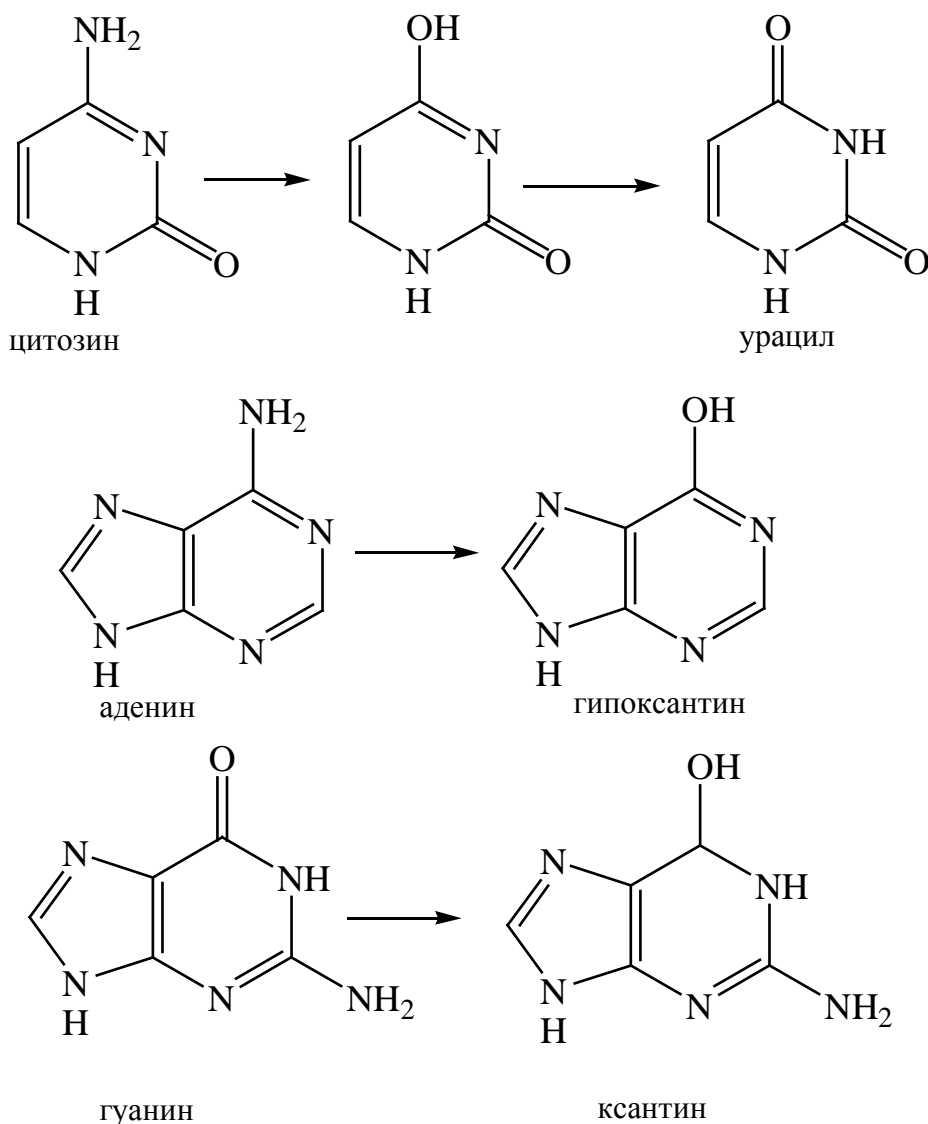
В РНК во 2-м положении рибозы имеются свободные гидроксильные группы, сильно влияющие на конформацию полимера. Отсутствие 2-ОН-группы в дезоксирибозе делает ДНК более устойчивой к щелочной деградации.

Как ДНК, так и РНК легко гидролизуются под действием кислот. Гликозидные связи в ДНК более лабильны, чем в РНК. Пуриновые

нуклеотиды гидролизуются легче, чем пиримидиновые, и все же ковалентная структура этих молекул сравнительно устойчива, что определяет их способность служить генетическим материалом.

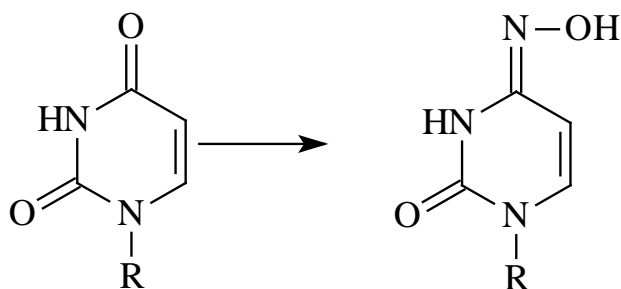
Однако как ДНК, так и РНК вступают во множество химических реакций по азотистым основаниям:

а) азотистая кислота реагирует с аминогруппами оснований, превращая их в гидроксильные группы, которые подвергаются таутомеризации и превращаются в кетогруппы. Таким образом, азотистая кислота превращает цитозин в урацил, аденин – в гипоксантин, гуанин – в ксантин и, следовательно, является эффективным химическим мутагеном:

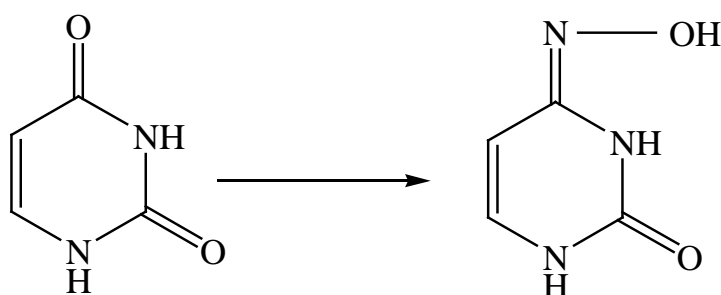


б) другое мутагенное соединение, гидроксилламин ($\text{H}_2\text{N}-\text{OH}$), реагирует с карбонильными группами, особенно в пиримидинах, даже

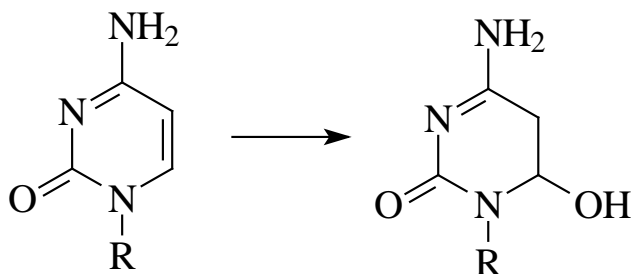
несмотря на то, что эти карбонильные группы являются частью циклической амидной структуры и поэтому имеют сравнительно низкую реакционную способность:



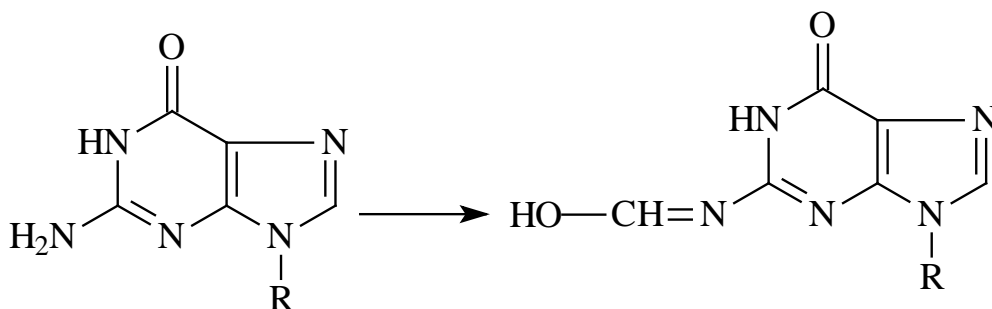
в) пириимидины легко восстанавливаются боргидридом натрия NaBH_4 :



г) уридин, тимидин и, в меньшей степени, цитозин в составе нуклеиновых кислот димеризуются при УФ-облучении; цитозин под действием УФ-света легко гидратируется:



д) формальдегид вступает в реакцию с аминогруппами пуриновых и пириимидиновых оснований:



Биологической ролью ДНК является хранение информации о белках, необходимых для жизни клетки, и передача этой информации дочерним клеткам.

Структурная организация ДНК достаточно сложна и имеет три уровня.

Первичная структура ДНК – это линейная цепь четырех видов дезоксирибонуклеотидов, соединенных фосфодиэфирной связью.

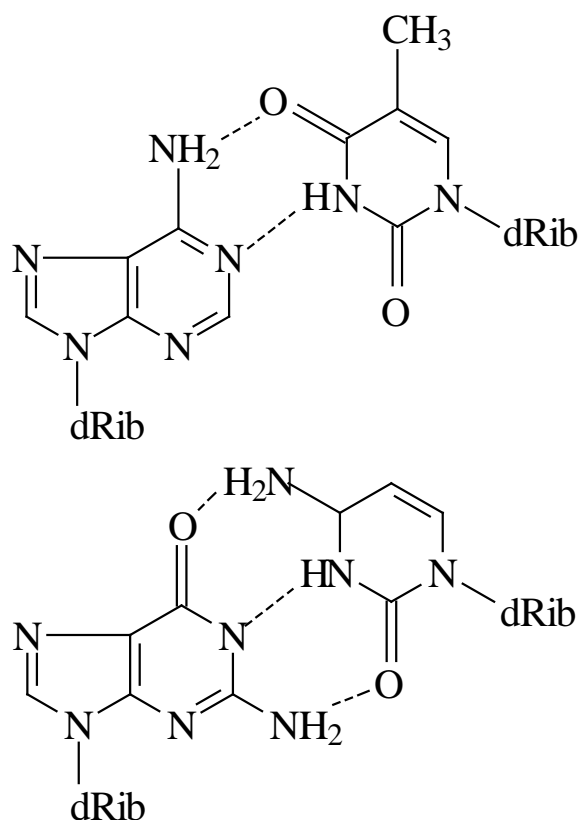
Вторичная структура ДНК – это двухцепочечная правозакрученная спираль из комплементарных друг другу антипараллельных полинуклеотидных нитей. Модель была предложена в 1953 г. Уотсоном и Криком.

Свойство комплементарности было выведено на основании некоторых закономерностей, отмеченных Чаргаффом, а именно:

- в каждом типе ДНК количество аденина примерно равно количеству тимина, а количество гуанина – количеству цитозина;
- сумма пуриновых оснований равна сумме пиримидиновых;
- напротив, соотношение аденин + тимин/гуанин + цитозин в различных организмах неодинаково.

Было установлено, что АТ-тип ДНК преобладает в животных и растительных клетках, а ГЦ-тип – в микроорганизмах. Сравнение организмов по их ГЦ-содержанию иногда используют как основу для установления филогенетического родства. Нужно, однако, учесть, что тимин под действием УФ-света претерпевает ряд фотохимических превращений, поэтому бактерии с высоким ГЦ-содержанием могут чаще встречаться там, где много солнечного света, тогда как более низкое ГЦ-содержание может указывать на то, что местообитанием данного организма являются более защищенные от солнца места.

Модель Уотсона и Крика позволила объяснить причину этих закономерностей – каждое основание одной цепи связано с комплементарным ему основанием другой цепи водородными мостиками. При этом аденин комплементарен тимину, а гуанин – цитозину. Таким образом, каждая пара состоит из одного пуринового и одного пиримидинового основания, причем пары комплементарных оснований близки и по размеру, и по форме. Пара А–Т может образовывать два, а пара Г–Ц – даже три водородных мостика:



Благодаря способности азотистых оснований к спариванию, образуется хорошо стабилизированная двухцепочечная структура, где пары оснований расположены внутри двойной спирали и образуют неполярную область ДНК. Гидрофобные взаимодействия между ароматическими основаниями стабилизируют структуру, преодолевая силы электростатического отталкивания между отрицательно заряженными фосфатными группами. Остатки дезоксирибозы двух антипараллельных цепей образуют правозакрученную спираль, где на каждый виток приходится 10 пар оснований. Внешняя сторона спирали заряжена отрицательно за счет фосфатных групп. В спирали существуют две бороздки – большая и маленькая.

На основании рентгеноструктурного анализа было установлено, что двойная спираль ДНК, кроме описанной выше формы *B*, благоприятной для репликации, может существовать в некоторых других формах: форме *A*, благоприятной для процессов транскрипции; форме *Z*, участвующей в регуляции экспрессии генов; форме *C*, выявленной у ряда вирусов. Все эти формы различаются диаметром, числом пар оснований в витке, углом наклона плоскости оснований по отношению к оси молекулы и способны взаимно переходить друг в друга в зависимости от условий среды.

В функциональном отношении две цепи ДНК неэквивалентны. Кодирующей цепью является та из них, которая считывается в процессе транскрипции. Именно эта цепь служит матрицей для РНК. Некодирующая цепь по последовательности подобна РНК при условии замены тимина на урацил. Общепринято давать структуру гена в виде последовательности не кодирующей цепи ДНК в направлении 5'→3'. Если прочесть кодоны в этом направлении, то с помощью генетического кода можно воспроизвести аминокислотную последовательность белка в принятом порядке, от N- к C-концу.

Третичная структура ДНК – более плотная упаковка с образованием сложных трехмерных структур. Прокариоты имеют кольцевую ДНК, закрученную в левую суперспираль. Эукариоты также образуют суперспираль, но не свободной ДНК, а ее комплексов с белками хромосом.

Дезоксирибонуклеопротейды – комплексы ДНК с белками хромосом – составляют *хроматин*. Его можно видеть в оптический микроскоп только во время деления клеток, когда он находится в составе хромосом в конденсированном виде. Гистоны формируют первичную степень компактизации хроматина – так называемые *нуклеосомы*. По две молекулы каждого из гистонов H2a, H2b, H3, H4 составляют октамер (кор), обвитый 1,8 витками спирали ДНК поверх белковой структуры. Участок ДНК (линкерная ДНК), непосредственно не связанный с гистоновым кором, взаимодействует с гистоном H1. Этот белок обеспечивает формирование вторичной суперспиральной структуры ДНК – *нуклеомеры*. Когда хроматин конденсируется далее за счет тех же H1 как скрепок, формируются петли – так называемая структура «ламповых щеток». Примерно 20 петель образуют минидиски – *хромонемы*. Большое число минидисков укладывается в стопку, составляя *хромосому*. Гистоны в октамере имеют подвижный N-конец из 20 аминокислот, который выступает из нуклеосомы и важен для поддержания структуры хроматина и контроля за генной экспрессией. Так, конденсация хромосом связана с фосфорилированием гистонов, а усиление транскрипции – с ацилированием в них остатков лизина. В хроматин входит также группа негистоновых белков. Она высоко гетерогенна и включает структурные ядерные белки, множество ферментов и факторов транскрипции, связанных с отдельными участками ДНК и осуществляющих регуляцию генной экспрессии и других процессов.

РНК принимают участие во всех стадиях процесса генной экспрессии и биосинтеза белка. Различают три основных вида РНК: ри-

босомальная, транспортная и матричная (информационная). РНК клетки существенно различаются по размерам и продолжительности существования, по вторичной и третичной структуре. Из-за стерических ограничений, вызванных ОН-группой во 2'-положении рибозы, РНК не могут образовывать структуры, подобные двойной спирали, и имеют менее регулярную вторичную структуру.

мРНК – короткоживущие и наиболее гетерогенные РНК. Они являются копиями определенных участков ДНК, в которых заключена информация о последовательности аминокислот в кодируемых ими белках. После синтеза мРНК транспортируются к рибосомам – белок-синтезирующим машинам клетки, где на их основе синтезируется необходимый клетке белок. В целом в линейной молекуле мРНК формируется несколько двуспиральных шпилек, на концах которых располагаются знаки инициации и терминации трансляции.

Транспортные РНК, активирующие аминокислоты и переносящие их к рибосомам, являются небольшими долгоживущими молекулами. Они содержат 70–90 нуклеотидов, которые с помощью своих антикодонов узнают за счет спаривания оснований определенные кодоны на мРНК. На 3'-конце всех тРНК, называемом *акцепторным*, обязательным является тринуклеотид ЦЦА, за счет которого и присоединяется определенная аминокислота. Каждой из 20 аминокислот соответствует своя тРНК. Для некоторых аминокислот, кодируемых двумя или более кодонами, существует несколько тРНК. В молекуле тРНК содержится довольно много минорных и модифицированных оснований – псевдоуридин, дигидроуридин, тимидин, встречающихся обычно в ДНК, а также много метилированных нуклеотидов, таких как 7-метилгуанидин. Конформацию молекулы стабилизируют многочисленные пары оснований, часть из которых не соответствует общим принципам спаривания оснований. Пространственное изображение вторичных структур всех тРНК имеет форму клеверного листа. В «клеверном листе» кроме акцепторного участка различают три обязательные петли:

а) антикодоновая содержит антикодон, представляющий собой специфический триплет нуклеотидов, который комплементарен в антипараллельном направлении кодону мРНК, кодирующему соответствующую аминокислоту;

б) псевдоуридиловая обеспечивает взаимодействие с рибосомами;

в) дигидроуридиловая обеспечивает взаимодействие тРНК с соответствующей аминоацил-тРНК-синтетазой.

Третичная структура тРНК очень компактна и чаще всего описывается термином «локтевой сгиб». Третичные структуры всех тРНК настолько похожи, что смесь различных тРНК образует кристаллы.

Самой длинной и долгоживущей является **рибосомальная РНК**, выполняющая роль структурного компонента рибосом. Число рибосом в клетке очень велико. Вторичная структура рРНК образуется за счет коротких двуспиральных участков молекулы – шпилек, чередующихся с одноцепочечными участками, к которым присоединяются белки. Третичная структура рРНК – образование в комплексе с рибосомальными белками малой и большой субъединицы рибосом.

Нуклеиновые кислоты могут денатурировать. Этот процесс состоит в расхождении цепей двойной спирали ДНК и двуспиральных участков молекулы РНК. Денатурацию можно вызвать нагреванием, добавлением кислоты, щелочи, спиртов, мочевины или удалением стабилизирующих структуру молекулы противоионов, например Mg^{2+} . В результате денатурации каждая из цепей молекулы приобретает форму беспорядочно свернутого клубка. Денатурация ДНК сопровождается усилением оптического поглощения в УФ-области пуриновых и пиримидиновых оснований. Это явление называют **гиперхромным эффектом**. В нативном состоянии нуклеиновые кислоты поглощают свет менее интенсивно, чем в денатурированном. Этот так называемый **гипохромный эффект** обусловлен гидрофобными взаимодействиями между основаниями, плотно уложенными в стопку в структуре нативной молекулы.

Тепловая денатурация нуклеиновых кислот происходит в довольно узком интервале температур. Характерным параметром процесса является температура плавления. Температурная зависимость поглощения УФ-света при 260 нм называется **кривой плавления**. Температура плавления $T_{пл}$ – это точка, при которой прирост поглощения составляет половину максимального. Чем выше ГЦ-содержание нуклеиновой кислоты, тем более устойчива она к денатурации, причем зависимость $T_{пл}$ от ГЦ-содержания почти линейна. Точное соотношение между ГЦ-содержанием ДНК и $T_{пл}$ очень сильно зависит от ионного состава и pH среды. Полная денатурация молекулы ДНК приводит к расхождению комплементарных цепей. При быстром охлаждении раствора денатурированной ДНК цепи остаются в разделенном состоянии. Однако если в течение какого-то времени поддерживать температуру чуть ниже температуры плавления (этот процесс называют **отжигом**), может вновь восстановиться нативная структура. Этот факт

дает в руки ученым очень важный метод исследования нуклеиновых кислот, основанный на образовании гибридов.

Одним из типов двойных спиралей, которые получают искусственным путем, является гибрид ДНК-РНК. Оказалось, что молекулы мРНК гибридизируются с одной из двух разделившихся цепей ДНК, несущей участки, комплементарные мРНК. Метод гибридизации используется также для получения гетеродуплексов ДНК, в которых две цепи молекулы происходят от двух разных генетических линий одного и того же вида организмов. Известно, что некоторые мутации состоят в выпадении или вставке одного или нескольких оснований в цепь ДНК. Гетеродуплексы, в которых одна из цепей нативная, а другая – со вставкой или делецией, имеют по всей своей длине нормальную структуру по Уотсону – Крику, за исключением тех участков, где делеции или вставки нарушают комплементарность и образуются одноцепочечные петли.

Опыты по гибридизации позволили исследовать гомологичность нуклеиновых кислот из разных источников. Вначале молекулы расщепляют с помощью ультразвука на фрагменты длиной около 1000 нуклеотидов и подвергают денатурации. Фрагменты денатурированной ДНК смешивают с денатурированной ДНК из другого источника. Участки ДНК разных видов, имеющие близкие нуклеотидные последовательности, в той или иной степени гибридизуются, тогда как участки с сильно различающимися последовательностями гибридизации не поддаются.

Тема 8. Строение углеводов и углеводсодержащих биополимеров

Моносахариды, их олигомеры (олигосахариды) и полимеры (полисахариды) составляют класс **углеводов**.

Моносахариды (глюкоза, фруктоза, рибоза) представляют собой альдегиды или кетоны, содержащие две или более ОН-группы, общей формулой $(\text{CH}_2\text{O})_n$. Кроме гидроксильных и карбонильных групп они могут содержать тиольные, карбоксильные, аминогруппы и др.

Полисахариды (целлюлоза, крахмал, гликоген, хитин) являются продуктами поликонденсации моносахаридов. Полисахариды, построенные из остатков одного и того же моносахарида, называются *гомополисахаридами*, а полисахариды, содержащие остатки различных моносахаридов, – *гетерополисахаридами*.

Олигосахариды (сахароза, лактоза) составляют промежуточную группу между моно- и полисахаридами и содержат от 2 до 10 моносахаридных остатков.

Биологические функции углеводов:

1) энергетическая – углеводы служат источником энергии для организма. При окислении 1 г углеводов выделяется 17,6 кДж (4,2 ккал) энергии. Следует отметить, что сахара являются главным источником быстро мобилизуемой энергии, так как в процессе пищеварения они легко переводятся в форму, пригодную для удовлетворения энергетических потребностей клеток;

2) строительная – целлюлоза входит в состав клеточных стенок растений, хитин обнаруживается в клеточной стенке грибов и в наружном скелете членистоногих, гликопротеиды – соединения углеводов с белками – входят в состав хрящевой и костной ткани животных;

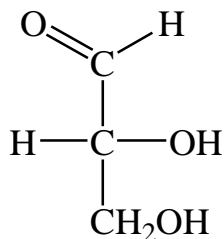
3) запасаящая – выражается в том, что крахмал накапливается клетками растений, а гликоген – клетками животных. Эти вещества служат для клеток и организмов источником глюкозы, которая легко высвобождается по мере необходимости;

4) защитная – гепарин – ингибитор свертывания крови; слизи, выделяемые различными железами и богатые углеводами, предохраняют пищевод, кишечник, желудок, бронхи от механических повреждений, препятствуют проникновению в организм бактерий и вирусов; каме-

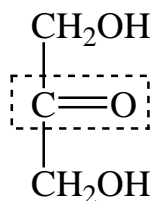
ди, выделяющиеся в местах повреждения стволов и ветвей, защищают деревья и кустарники от проникновения инфекций через раны;

5) составная часть жизненно важных веществ – входят вместе с белками в состав ферментов, входят в состав ДНК, РНК, АТФ, участвуют в синтезе коферментов НАД⁺, НАДФ⁺, ФАД⁺.

Простейшие из моносахаридов ($n = 3$) называются *триозами*. К ним относятся глицеральдегид и дигидроксиацетон. Глицеральдегид назван *альдозой*, так как он содержит альдегидную группу, а дигидроксиацетон – *кетозой*, поскольку в его состав входит кетогруппа:

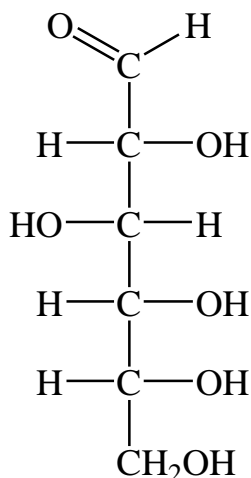


D-глицеральдегид

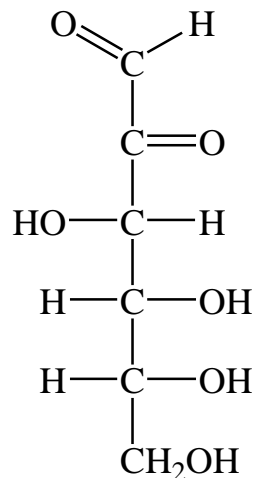


дигидроксиацетон

Моносахариды с четырьмя, пятью и шестью атомами углерода называются соответственно тетрозами, пентозами и гексозами. Так, из гексозных сахаров *D*-глюкоза является альдозой, а *D*-фруктоза – кетозой:

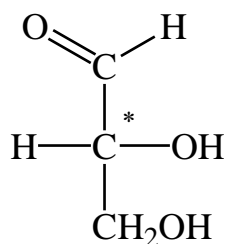


D-глюкоза

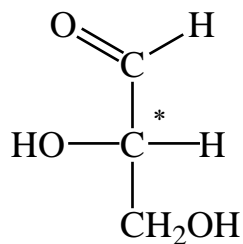


D-фруктоза

Природные моносахариды обладают оптической активностью, причем величина удельного вращения является характерным параметром моносахарида. Все моносахариды, за исключением дигидроксиацетона, содержат один или более асимметрических атома углерода. Простейшей альдозой, имеющей один асимметрический атом углерода, является глицеральдегид, существующий в двух стереоизомерных формах – *D*- и *L*-изомеров:

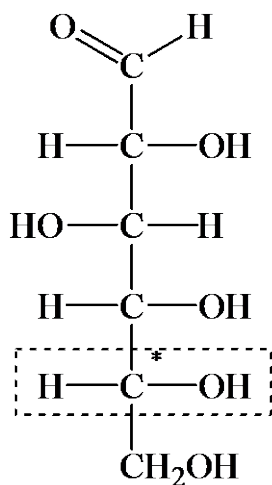


D-глицеральдегид

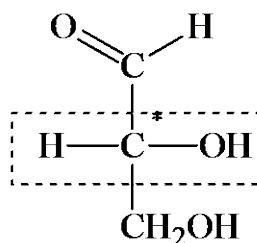


L-глицеральдегид

Моносахариды, содержащие два и более асимметрических атома углерода, относятся к *D*- или *L*-ряду в зависимости от конфигурации асимметрического атома углерода, наиболее удаленного от альдегидной или кетогруппы. Моносахарид (изображенный в проекциях Фишера) относят к *D*-ряду, если OH-группа асимметрического атома углерода, наиболее удаленного от альдегидной или кетогруппы, находится справа, а атом водорода – слева, как в *D*-глицеральдегиде. Если OH-группа асимметрического атома углерода, наиболее удаленного от альдегидной или кетогруппы, находится слева, а атом водорода – справа, как в *L*-глицеральдегиде, моносахарид относят к *L*-ряду:



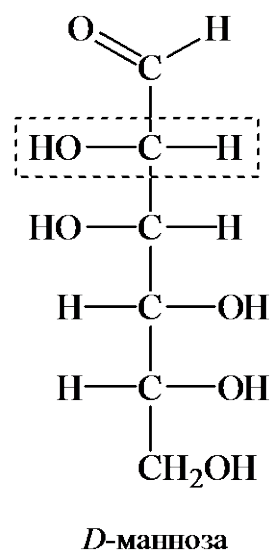
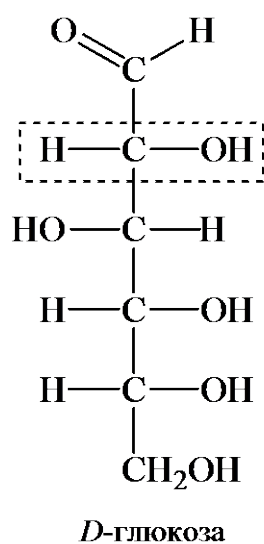
D-глюкоза



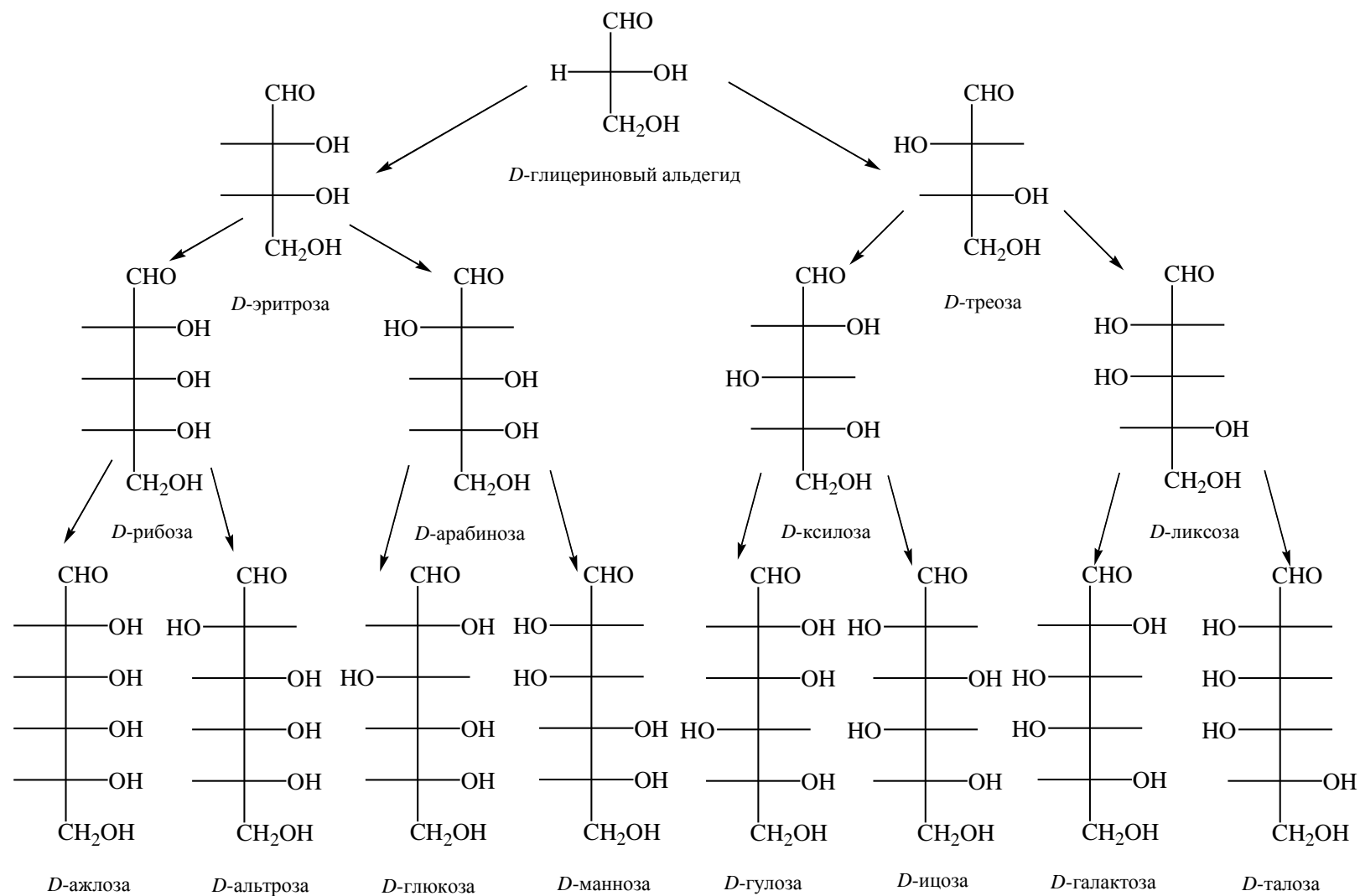
D-глицеральдегид

Простейшей кетозой, имеющей один асимметрический атом углерода, является тетроза – тетроулоза.

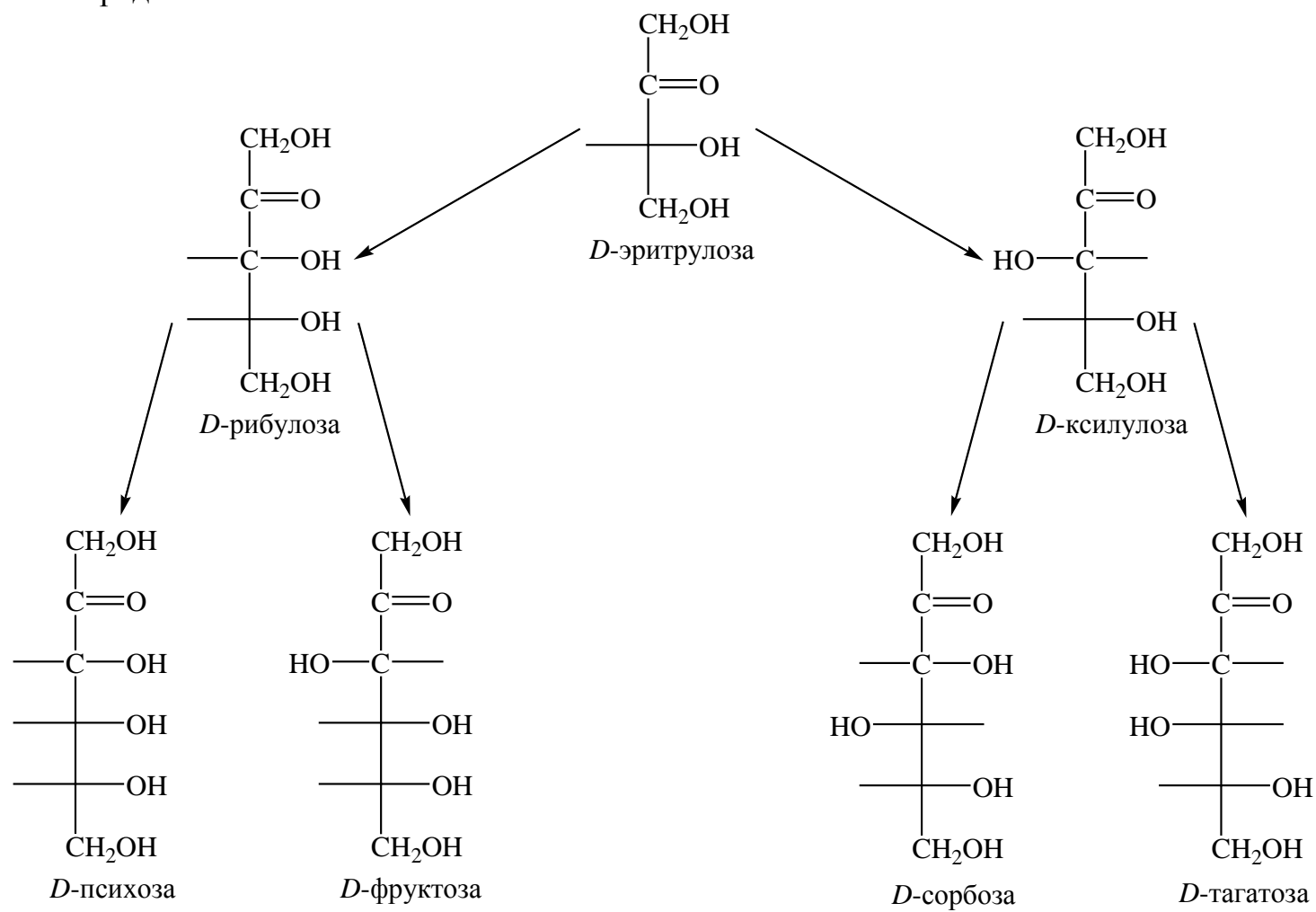
Два моносахарида, отличающиеся только по конфигурации одного определенного атома углерода, называются *эпимерами*. Например, *D*-глюкоза и *D*-манноза являются эпимерами по второму углеродному атому, а *D*-глюкоза и *D*-галактоза – эпимерами по четвертому углеродному атому:



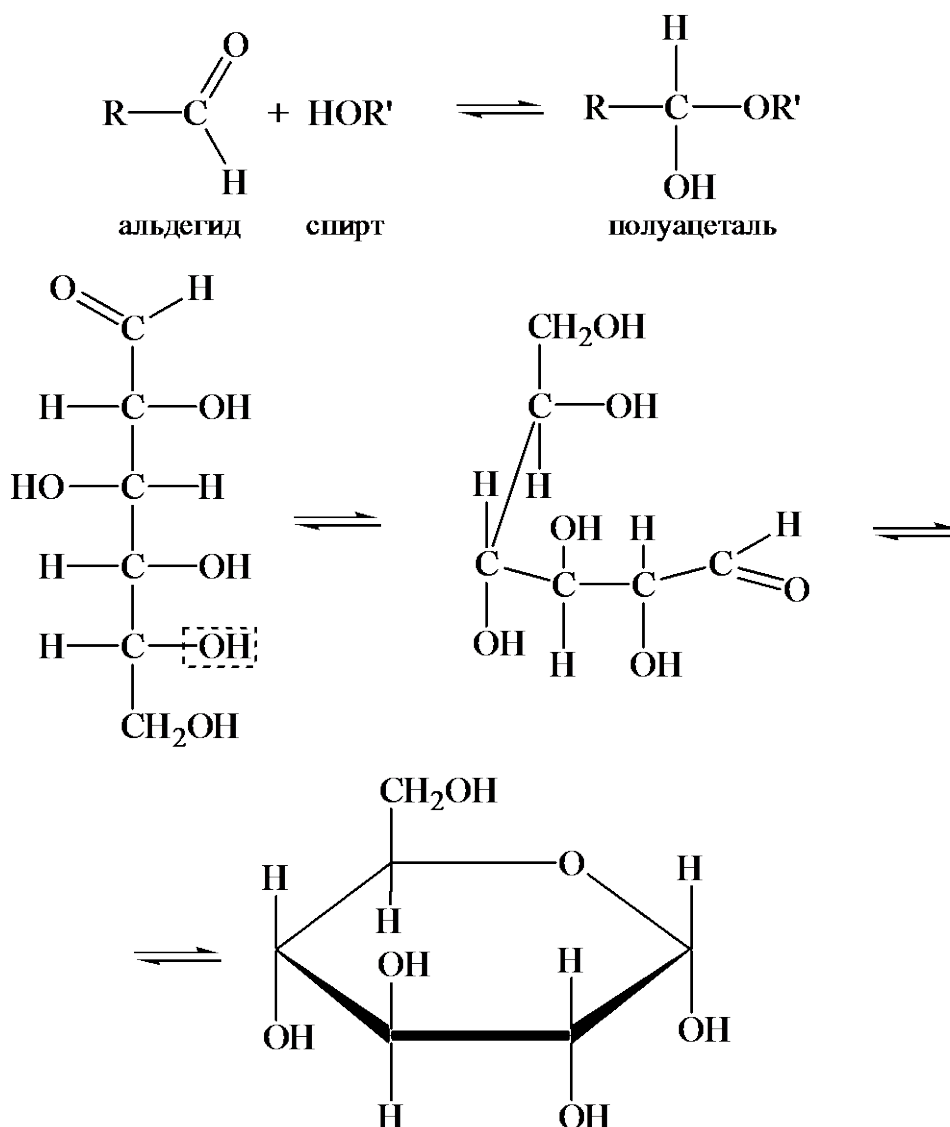
Ниже изображены альдозы *D*-ряда, родоначальником которых является *D*-глицериновый альдегид.



Кетозы *D*-ряда:

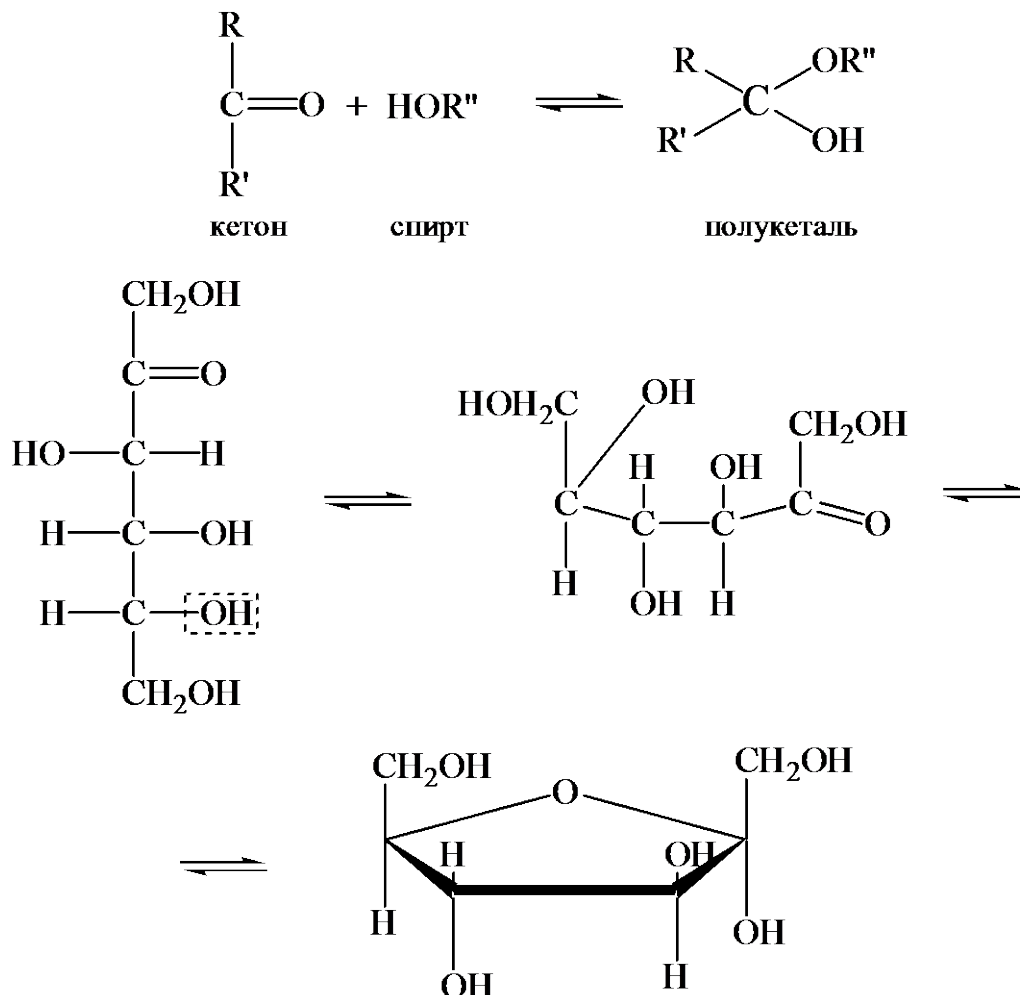


Приведенные выше структуры моносахаридов являются *ациклическими*. Однако моносахариды могут образовывать циклические структуры в результате взаимодействия карбонильной группы моносахарида с одной из его гидроксильных групп. Альдегидная группа обладает высокой реакционной способностью и может реагировать с -ОН-группой с образованием циклического *полуацетала*. Так, альдегидная группа при С1 атоме в молекуле глюкозы с открытой цепью реагирует с -ОН-группой при С5 атоме этой же молекулы, образуя внутримолекулярный полуацеталь. Образованный таким образом 6-членный циклический сахар называется *пиранозой* из-за его сходства с пираном.



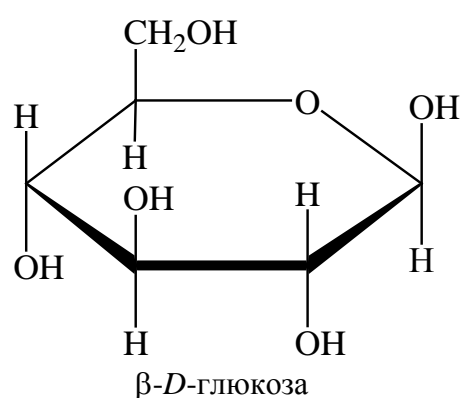
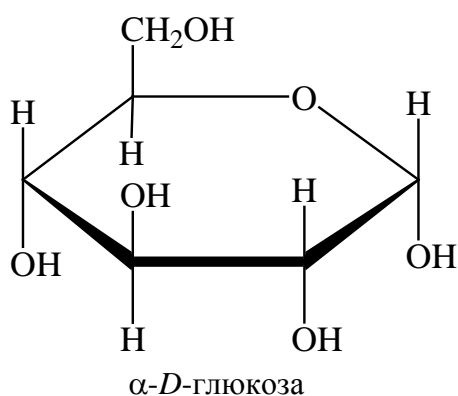
Подобно этому кетогруппа может реагировать с -ОН-группой с образованием циклического *полукетала*. Так, кетогруппа при С2 ато-

ме фруктозы с открытой цепью взаимодействует с -ОН-группой при C5 атоме с образованием внутримолекулярного полукетала. Этот 5-членный циклический сахар называется **фуранозой** из-за его сходства с фураном. У альдоз фуранозный цикл образуется с участием ОН-группы при C4 атоме.



При циклизации альдоз и кетоз возникает новый хиральный центр при C1 и C2 атомах, ранее входивших в состав альдегидной и кетогруппы соответственно. Это влечет за собой появление еще одной пары стереоизомеров (аномеров) для каждого моносахарида, которые отличаются друг от друга по конфигурации C1 (C2 у кетоз) карбонильного атома и называются **α-** и **β-изомерами (аномерами)**. Символ α означает, что -ОН-группа при C1 (C2 у кетоз) атоме расположена под плоскостью кольца, а символ β означает, что эта -ОН-группа находится над плоскостью кольца. C1 (C2 у кетоз) атом, находящийся в центре полуацетальной группы и непосредственно связанный с двумя атомами кислорода, называется **аномерным углеродным атомом**,

а гидроксил, образующийся при C1 (C2 у кетоз) атоме в результате циклизации моносахарида, называется **полуацетальным**. Он резко отличается по свойствам от других -ОН-групп молекулы и легко может замещаться на другие нуклеофильные группы с образованием различных производных моносахаридов. Циклические формы моносахаридов принято изображать в формулах Хеуорса, так как проекционные формулы Фишера дают весьма смутное представление о трехмерной структуре моносахаридов. Нижнюю часть кольца (жирные линии) представляют выступающей к наблюдателю, а противоположный край – лежащим за плоскостью рисунка. Примерная плоскость кольца перпендикулярна плоскости бумаги. Эти формулы однозначно указывают конфигурацию молекулы, но не отображают взаимного пространственного расположения групп, присоединенных к кольцу. Поэтому для изображения пространственной структуры моносахаридов применяются конформационные формулы:



ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МОНОСАХАРИДОВ

- **Реакции карбонильной группы.** Несмотря на то, что в таутомерной смеси моносахаридов равновесие смещено в сторону циклических (полуацетальных и полукетальных) форм, некоторое количество ациклической формы присутствует в растворе, что позволяет сахарам вступать в реакции, характерные для альдегидов и кетонов.

- **Окисление моносахаридов:**

- биологическое окисление до этилового спирта;
- получение альдоновых кислот. Под действием молекулярных брома, хлора, иода при pH = 5 альдозы окисляются до соответствующих лактонов, которые затем медленно гидролизуются с образованием свободных кислот;

– важное значение для выяснения строения сахаров имеет реакция избирательного окисления α -гликольной группировки, которая протекает под действием иодной кислоты и периодатов. Кроме α -гликолей, окислению периодатом подвергаются α -гидроксикарбонильные соединения, α -аминоспирты, α -кетотальдегиды и α -дикетоны.

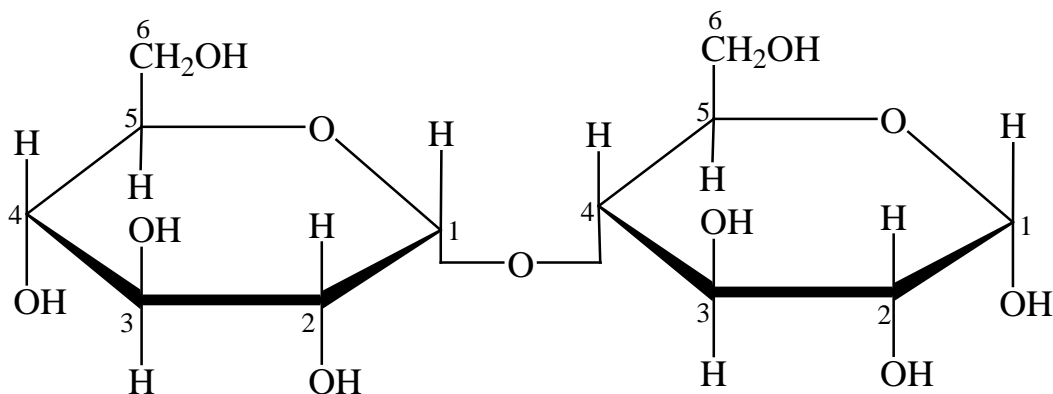
- **Действие кислот и оснований.** Альдозы и кетозы изомеризуются и распадаются с образованием различных продуктов, причем альдозы более устойчивы к воздействиям кислот и оснований, чем кетозы.

- **Реакция образования циклических ацеталей.**

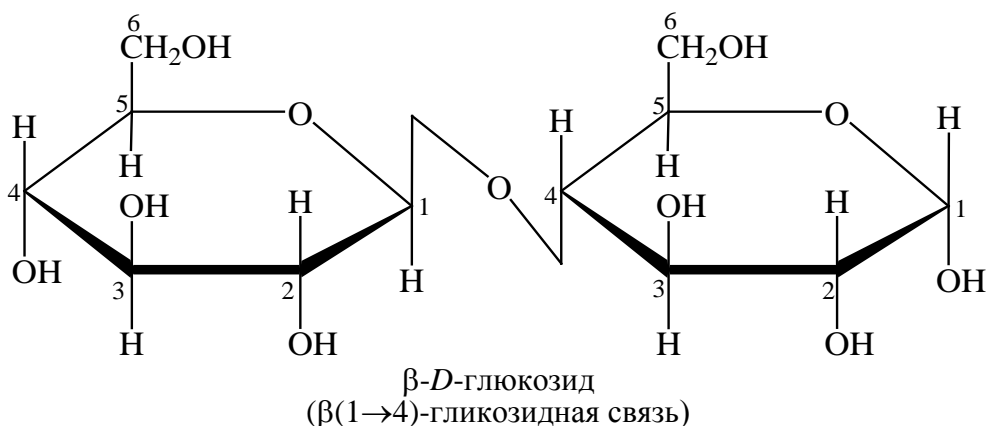
ГЛИКОЗИДНАЯ СВЯЗЬ И ОЛИГОСАХАРИДЫ

В молекулах олиго- и полисахаридов моносахаридные звенья соединены между собой *гликозидной связью*, в образовании которой участвуют полуацетальный гидроксил одного и любой гидроксил, в том числе и полуацетальный, другого моносахаридного остатка. Гликозидная связь образуется при взаимодействии двух моносахаридов в ходе реакции дегидратации. Гликозидные связи легко гидролизуются в присутствии кислот или под действием ферментов.

Для обозначения гликозидной связи необходимо указывать положение гидроксила при первом аномерном углеродном атоме (α - или β -), а также номер углеродного атома в молекуле второго остатка моносахарида. Например, $\alpha(1\rightarrow4)$ -гликозидная связь в мальтозе сформирована между атомом кислорода при первом углеродном атоме в α -положении одного остатка α -D-глюкозы и углеродным атомом в положении 4 второго остатка β -D-глюкозы:

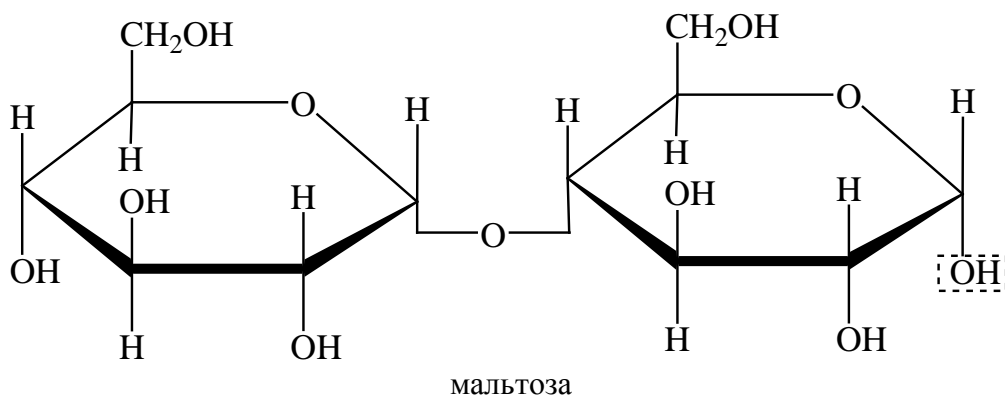


α -D-глюкозид
($\alpha(1\rightarrow4)$ -гликозидная связь)

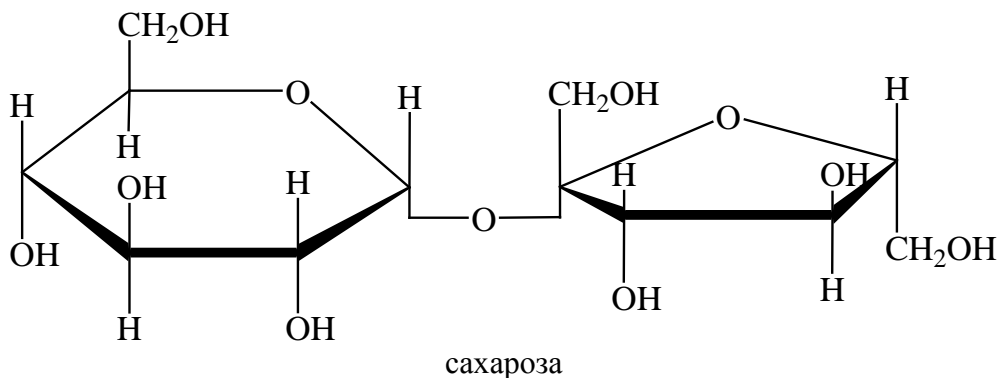


Наиболее часто в природных полисахаридах встречаются гликозидные связи типа α(1→4), α(1→6), β(1→4), β(1→3), а мономерами служит *D*-глюкоза.

Если один из концевых моносахаридных остатков олигосахарида содержит полуацетальный гидроксил, который может находиться как в α-, так и β-форме, олигосахарид называется **восстанавливающим**, или **редуцирующим**. Примером могут служить дисахариды мальтоза и лактоза:



Если же в образовании гликозидной связи между остатками моносахаридов участвуют оба полуацетальных гидроксила двух моносахаридов, такой олигосахарид не содержит концевой полуацетальный гидроксил и называется **невосстанавливающим**, или **нередуцирующим**. К ним относятся дисахариды сахароза и трегалоза:



ПОЛИСАХАРИДЫ

В природе углеводы встречаются в основном в форме полисахаридов. Они представляют собой длинные полимерные цепочки, которые построены из остатков моносахаридов, соединенных между собой гликозидными связями. Полисахариды присутствуют во всех клетках и выполняют в них структурную, рецепторную, защитную функции, а также играют роль запасных веществ. В состав полисахаридов могут входить различные моносахариды. Полисахариды, построенные из остатков одного и того же моносахарида, называются **гомополисахаридами**, а полисахариды, содержащие остатки различных моносахаридов, – **гетерополисахаридами**. Чаще всего в составе полисахаридов встречается *D*-глюкоза. Нередко полисахариды имеют заместители неуглеводной природы – остатки серной, фосфорной или органических кислот.

Полисахариды различаются также по типу гликозидной связи, молекулярной массе и степени разветвленности макромолекул. Молекулярная масса полисахаридов колеблется в широких пределах – от нескольких тысяч до нескольких миллионов дальтон.

Большинство полисахаридов имеют тривиальные названия, связанные с источником, из которого они были выделены, например целлюлоза, крахмал, хитин. Основой более строгой номенклатуры служит моносахаридный состав полисахарида: *D*-**глюканом** называется полисахарид, построенный из остатков *D*-глюкозы.

Крахмал преобладает в клетках растений, микроводорослей, некоторых бактерий. Состоит из двух компонентов: α -амилозы и амилопектина. α -Амилоза представляет собой линейный полимер α -*D*-глюкозы (1000–4000 звеньев), остатки которой соединены с помощью $\alpha(1\rightarrow4)$ -гликозидных связей. При этом в молекуле появляется большая свобода вращения вокруг связей C1–O и O–C4, и цепочка образует стабильную спираль с шестью остатками глюкозы на один виток. Молекулы иода по своим размерам точно подходят к центральной полости этой спирали и образуют комплекс, обуславливающий приобретение темно-синей окраски растворами α -амилозы при иодно-крахмальном тесте.

Амилопектин состоит из образующих остов молекулы цепей поли- α -*D*-глюкозы с $\alpha(1\rightarrow4)$ -гликозидными связями. От этих цепей отходят боковые ветви, присоединенные к основной цепи $\alpha(1\rightarrow6)$ -гликозидными связями. Ветви являются более короткими цепочками

$\alpha(1\rightarrow4)$ -глюкозида, содержащего 12 остатков *D*-глюкозы, и мешают основной цепи образовывать спираль. Амилопектин в отличие от α -амилозы имеет разветвленную структуру и вместе с α -амилозой образует сложную сеть. Молекулы амилопектина содержат сотни тысяч остатков α -*D*-глюкозы, являясь одними из самых крупных природных молекул.

Гликоген преобладает в клетках животных, грибов и некоторых бактерий. Гликоген состоит из остатков α -*D*-глюкозы, соединенных $\alpha(1\rightarrow4)$ -гликозидными связями. Его структура сильно напоминает структуру амилопектина, но у гликогена боковые ветви, присоединенные к основной цепи $\alpha(1\rightarrow6)$ -гликозидными связями, расположены значительно чаще, чем у амилопектина, т. е. гликоген отличается от амилопектина большей разветвленностью и более плотной упаковкой молекулы. У гликогена отсутствует спиральная структура, и его молекулы еще более «открыты» действию ферментов.

Клеточные стенки растений обладают необычайной прочностью, и в процессе роста растения меняют свою структуру и состав. Основными компонентами клеточных стенок растений являются полисахариды, среди которых преобладает **целлюлоза**, в значительной степени определяющая архитектуру клеточной стенки. Этот гомополисахарид является самым распространенным углеводом на Земле (древесина содержит ~50% целлюлозы).

Мономерами целлюлозы служат остатки β -*D*-глюкозы, соединенные в длинные цепочки (до 10 000 остатков глюкозы в каждой) с помощью $\beta(1\rightarrow4)$ -гликозидных связей. В такой молекуле отсутствует полная свобода вращения вокруг C1–O и O–C4-связей, и полимер приобретает конформацию, благоприятную для образования межцепочечных поперечных водородных связей в случае, когда цепочки располагаются антипараллельно. В результате молекулы целлюлозы объединяются в *микрофибриллы* толщиной 10–25 нм. Они перевиваются и образуют тонкие нити, которые, в свою очередь, могут обматываться одна вокруг другой, как пряди в канате, формируя *макрофибриллы*. Каждая макрофибрилла имеет толщину ~0,5 мкм и длину 6–8 мкм. Прочность их сопоставима с прочностью стальной проволоки. Кроме того, отдельные участки микрофибрилл имеют упорядоченное строение и придают клеточной стенке кристаллические свойства.

Таким образом, целлюлоза за счет сложности своей структуры и высокой упорядоченности выполняет в растении защитную и опорную функции. В таком виде полисахариды недоступны действию соб-

ственных ферментов, и целлюлоза не может использоваться растением как резервное вещество. Только некоторые бактерии, грибы, простейшие обладают ферментными системами, способными расщеплять целлюлозу.

Хитин – один из наиболее распространенных в природе полисахаридов – каждый год на Земле в живых организмах образуется и разлагается около 10 гигатонн хитина. Выполняет защитную и опорную функции, обеспечивая жесткость клеток: содержится в клеточных стенках грибов.

Главный компонент экзоскелета членистоногих.

Также хитин образуется в организмах многих других животных – разнообразных червей, кишечнополостных и т. д. Во всех организмах, вырабатывающих и использующих хитин, он находится не в чистом виде, а в комплексе с другими полисахаридами, и очень часто ассоциирован с белками.

Пектиновые вещества, или пектины, – полисахариды, образованные остатками главным образом галактуроновой кислоты. Присутствуют во всех высших растениях, особенно много их во фруктах и в некоторых водорослях. Пектины, являясь структурным элементом растительных тканей, способствуют поддержанию в них тургора, повышают засухоустойчивость растений, устойчивость овощей и фруктов при хранении. Используются в пищевой промышленности в качестве структурообразователей (гелеобразователей), загустителей, а также в медицинской и фармацевтической промышленности в качестве физиологически активных веществ с полезными для организма человека свойствами.

Агароза – полисахарид из красных водорослей, представляет собой разветвленную цепь из галактозы и 3,6-ангидрогалактозы с $\beta(1\rightarrow4)$ типом связи, в точках ветвления $\beta(1\rightarrow3)$. Является водорастворимым полисахаридом, защищает водоросли от высыхания. Используется в микробиологии как гелевая основа питательных сред (агар-агар).

Декстран – компонент слизи некоторых бактерий, предохраняющий их от высыхания. Представляет собой полимер глюкозы, связанной преимущественно в положении $\alpha(1\rightarrow6)$, а в точках ветвления в положении $\alpha(1\rightarrow3)$. В воде декстран образует вязкие слизи или гели, из которых путем введения поперечных связей получают гидрофильные сорбенты для хроматографии – «сефадекс». Растворимый декстран находит применение в качестве заместителя плазмы при переливании крови.

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И АНАЛИЗА ПОЛИСАХАРИДОВ

Природные полисахариды очень разнообразны по своей структуре, поэтому не существует единых подходов к их выделению из биологического материала. Легче всего выделять экзогенные полисахариды, так как они находятся вне клетки. Для этого клетки осаждают, а из раствора удаляют белки и низкомолекулярные полипептиды. Затем осуществляют экстракцию полисахаридов разбавленными растворами солей или органических кислот и их осаждение этанолом или другими органическими растворителями, смешивающимися с водой.

Эндогенные полисахариды (резервные и структурные) выделяют из биологического материала после гомогенизации клеток, что усложняет методику их выделения. В остальном процедура выделения эндогенных полисахаридов аналогична таковой для экзогенных полисахаридов.

Определение структуры полисахаридов является достаточно сложной задачей. Для выделения полисахарида высокой степени чистоты его несколько раз переосаждают из раствора. После этого проводят кислотный или ферментативный гидролиз полисахарида, продуктами которого являются олиго- и моносахариды. Полученный гидролизат анализируют на присутствие моно-, олиго- и полисахаридов с помощью цветных реакций, а также хроматографических методов либо подвергнутый химической модификации гидролизат анализируют методами хроматомасс-, ЯМР-спектроскопии, электрофореза и др.

Тема 9. Структура, свойства и химический синтез липидов

Липидами называют очень большую группу структурно и функционально различных соединений, обладающих общим свойством – *гидрофобностью*. Они нерастворимы в воде и растворимы в неполярных растворителях (хлороформе, диэтиловом эфире или бензоле). Большинство липидов не являются высокополимерными соединениями и состоят из нескольких связанных друг с другом молекул. Известно несколько классов липидов, отличающихся друг от друга природой остатков жирных кислот, входящих в состав липида. В молекулах липидов часто присутствуют ионные группы (PO_4^{3-} , NH^{3+}) или полярные углеводные компоненты.

В организме липиды выполняют *структурную* (в составе биомембран), *защитную*, *транспортную* (характерна для липопротеинов, транспортирующих липиды), *энергетическую* и *регуляторную* функции. Липиды являются компактной и энергоёмкой формой хранения энергии, что обусловлено большим содержанием в их молекулах С–Н-связей, при окислении которых выделяется большее количество энергии по сравнению с другими органическими молекулами.

Некоторые вещества, относимые к липидам, обладают биологической активностью – это витамины и их предшественники, некоторые гормоны. Они участвуют в реакциях биосинтеза, поддерживают оптимальную активность ферментов, регулируют рост клеток и др.

КЛАССИФИКАЦИЯ ЛИПИДОВ

По полярности различают неполярные и полярные липиды. Такое разделение основано на их растворимости в органических растворителях различной полярности. К **неполярным** липидам относятся свободные жирные кислоты и их эфиры, моно-, ди- и триацилглицерины, стеролы, воски, углеводороды, которые растворяются в неполярных растворителях (гексане, бензине, диэтиловом эфире). К **полярным** липидам относятся фосфо- и гликолипиды,

растворимые в полярных и протонных растворителях (ацетоне и этаноле).

По взаимодействию со щелочами липиды разделяют на омыляемые и неомыляемые. **Омыляемые** при взаимодействии со щелочами гидролизуются с отщеплением жирных кислот и образуют соли высших жирных кислот – мыла. К ним относятся триацилглицерины, воски, фосфо- и гликолипиды. **Неомыляемые** липиды не содержат жирнокислотных остатков, поэтому при взаимодействии со щелочами не гидролизуются и не образуют мыл. К ним относятся стеролы, терпеноиды, каротиноиды, жирорастворимые витамины и провитамины.

Омыляемые липиды, в свою очередь, делят на простые и сложные. **Простые** липиды состоят только из остатков жирных кислот и 1-, 2- или 3-атомных спиртов, образующих сложные эфиры. Это триацилглицерины и воски (эфиры высших жирных кислот и одноатомных спиртов). **Сложные** липиды представляют собой сложные эфиры жирных кислот и спиртов с замещенными группами. Это фосфо- и гликолипиды.

Жирные кислоты. Это алифатические карбоновые кислоты с числом углеродных атомов C4–C22. Они входят в состав омыляемых липидов, являются одним из основных источников энергии в клетке («топливные молекулы»). Жирные кислоты могут быть насыщенными и ненасыщенными, содержащими одну или несколько двойных связей (тройные связи встречаются редко). Следовательно, жирные кислоты различаются длиной углеводородной цепи, числом и положением двойных связей. Как видно из табл. 2, температура плавления жирных кислот повышается с увеличением длины углеводородной цепи.

Жирные кислоты, входящие в состав липидов высших растений и животных, как правило, содержат четное число углеродных атомов (12–22), что связано со способом их синтеза с участием 2-углеродного предшественника ацетил-СоА, и являются неразветвленными. Среди них чаще всего встречаются жирные кислоты с 16 и 18 углеродными атомами. Жирные кислоты, содержащие 18 атомов углерода (с двумя двойными связями и более), не синтезируются в животном организме и называются **незаменимыми** (эссенциальными), или **витаминами F**. Поэтому они должны обязательно присутствовать в пище. Состав и свойства жирных кислот сведены в табл. 2.

Таблица 2

Состав и свойства жирных кислот

Кислота	Число атомов углерода: число двойных связей, положение двойных связей	Температура плавления, °С
Насыщенные жирные кислоты		
Масляная (н-бутановая)	C4 : 0	–5,3
Валериановая (пентановая)	C5 : 0	–34,5
Капроновая (гексановая)	C6 : 0	–3,2
Каприловая (октановая)	C8 : 0	+16,5
Каприновая (декановая)	C10 : 0	+31,6
Лауриновая (додекановая)	C12 : 0	+44,8
Миристиновая (тетрадекановая)	C14 : 0	+54,4
Пальмитиновая (гексадекановая)	C16 : 0	+62,9
Стеариновая (октадекановая)	C18 : 0	+70,1
Арахидовая (эйкозановая)	C20 : 0	+76,1
Бегеновая (докозановая)	C22 : 0	+80,0
Лигноцериновая (тетракозановая)	C24 : 0	+84,2
Церотиновая (гексакозановая)	C26 : 0	+87,8
Монтановая (октакозановая)	C28 : 0	+90,9
Мелиссовая (триаконтановая)	C30 : 0	+93,6
Ненасыщенные жирные кислоты		
Пальмитоолеиновая (гексадецен-9-овая)	C16 : 1, Δ9	цис- +0,5 транс- +31,0
Олеиновая (цис-октадецен-9-овая)	C18 : 1, Δ9	+16,0
Линолевая (октадекадиен-9,12-овая)	C18 : 2, Δ9,12	цис- –43,0 транс- –13,0
α-Линоленовая (октадекатриен-9,12,15-овая)	C18 : 3, Δ9,12,15 (ω3-ряд)	–75,0
Арахидоновая (эйкозатетраен-5,8,11,14-овая)	C20 : 4, Δ5,8,11,14 (ω6-ряд)	–75,0
Эруковая (докозен-13-овая)	C22 : 1, Δ13	цис- +33,5 транс- +60,0

В липидах высших организмов двойная связь моновенасыщенных жирных кислот находится в основном между 9-м и 10-м углеродными атомами. В жирных кислотах, содержащих две или более двойных связей, эти связи несопряженные ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$). Двойные

связи почти всех природных ненасыщенных жирных кислот имеют цис-конфигурацию. Среди насыщенных жирных кислот у высших организмов чаще встречаются пальмитиновая (C16 : 0) и стеариновая (C18 : 0) кислоты, а среди ненасыщенных – олеиновая (C18 : 1), линолевая (C18 : 2), линоленовая (C18 : 3), арахидоновая (C20 : 4) кислоты.

Насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты различаются по конфигурации. В насыщенных жирных кислотах углеводородная цепь может принимать множество конформаций вследствие полной свободы вращения вокруг каждой С–С-связи. Однако самой вероятной является энергетически более выгодная вытянутая конформация.

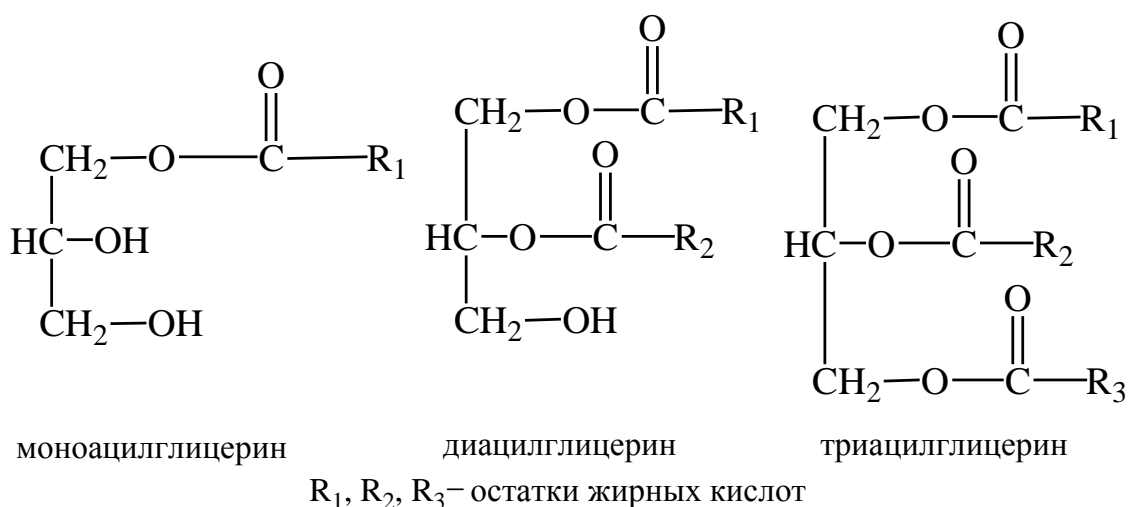
В ненасыщенных жирных кислотах невозможность вращения вокруг цис-двойной связи обуславливает жесткий изгиб углеводородной цепи под углом $\sim 30^\circ$. В случае транс-двойной связи конформация углеводородной цепи мало отличается от таковой насыщенных жирных кислот.

В полиненасыщенных жирных кислотах цис-конфигурация двойных связей придает углеводородной цепи изогнутый и укороченный вид. Это имеет существенное значение при формировании биомембран клетки.

Биосинтез жирных кислот. Биосинтез жирных кислот катализируется синтазой жирных кислот. Эта ферментная система локализована в цитоплазме и нуждается в качестве затравки в ацетил-КоА. В циклической реакции одна молекула удлиняется семикратно на C₂-звена. В качестве конечного продукта реакции образуется анион C₁₆-кислоты, пальмитат. Фактический субстрат реакции удлинения цепи малонил-КоА на каждой стадии конденсации отщепляет карбоксильную группу в виде CO₂. Восстановителем в синтезе жирных кислот является НАДФН + H⁺. В результате на синтез одной молекулы пальмитата расходуется одна молекула ацетил-КоА, 7 молекул малонил-КоА и 14 молекул НАДФН + H⁺; при этом образуются 7 молекул CO₂, 6 молекул H₂O, 8 молекул КоА и 14 молекул НАДФ⁺.

Основным компонентом различных масел и жиров являются сложные эфиры глицерина и жирных кислот – *ацилглицерины*. Это важнейший класс запасных липидов у растений и большинства животных. Если одна или две ОН-группы глицерина этерифицированы жирными кислотами, такие соединения называются *моноацил-* и *диацилглицеринами* соответственно. Если все три ОН-группы глицерина этерифицированы жирными кислотами, такое соединение на-

зывается *триацилглицерином*. Они составляют основную массу природных неполярных липидов и различаются природой и расположением жирнокислотных остатков. Если во всех 3-х положениях находятся остатки одной и той же жирной кислоты – это простые триацилглицерины. В случае присутствия в молекуле 2-х или 3-х разных остатков жирных кислот речь идет о смешанных триацилглицеринах. Большинство природных липидов представляют собой сложные смеси простых и смешанных триацилглицеринов. Твердые при обычной температуре и содержащиеся в животных тканях триацилглицерины называются **жирами**, а жидкие триацилглицерины растительного происхождения – **маслами**.



Свойства триацилглицеринов определяются свойствами входящих в их состав жирных кислот, так как второй структурный элемент – глицерин – одинаков для всех триацилглицеринов. Температура плавления триацилглицеринов повышается с увеличением числа и длины цепи остатков насыщенных жирных кислот.

При щелочном или кислотном гидролизе молекулы триацилглицеринов расщепляются по сложноэфирным связям до глицерина и свободных жирных кислот. В результате щелочного гидролиза или омыления образуются глицерин и соли высших жирных кислот – **мыла**. Аналогично идет гидролиз триацилглицеринов под действием фермента липазы. Так же, как и свободные жирные кислоты, но в меньшей степени триацилглицерины окисляются кислородом воздуха (особенно при повышенных температурах) с образованием перекисных соединений, оксикислот и продуктов полимеризации.

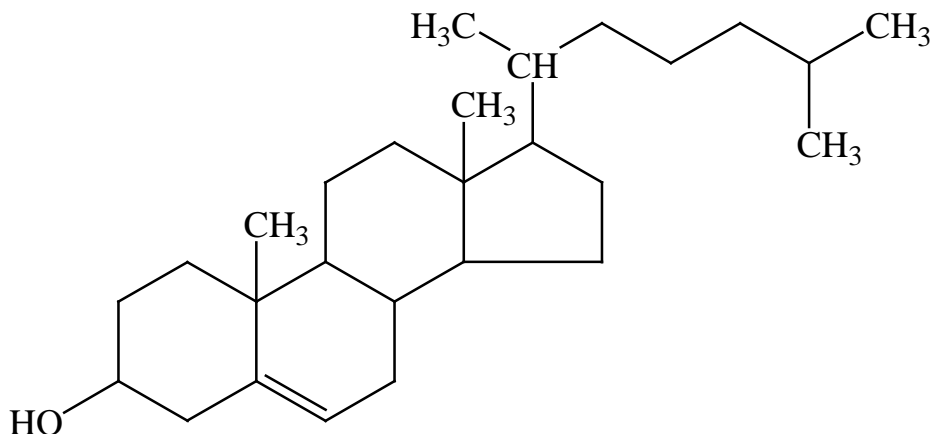
Если к С1 и С3-атомам глицерина присоединяются остатки двух разных жирных кислот, второй углеродный атом глицерина становится

ся асимметрическим. Природные триацилглицерины, содержащие асимметрический атом углерода, соответствуют *L*-конфигурации. При описании пространственного строения триацилглицеринов масел и жиров принято считать, что первый углеродный атом глицерина находится на верху цепи и обозначается *sn*-1.

Теоретически каждая из трех ОН-групп глицерина может быть этерифицирована любой жирной кислотой, и количество различных триацилглицеринов должно быть огромным. Однако в природе синтезируется относительно небольшое число триацилглицеринов, а из каждой пары возможных оптических изомеров – только один. Причем ненасыщенные жирные кислоты присоединяются преимущественно к ОН-группе глицерина в *sn*-2-положении.

Значительная часть ненасыщенных жирных кислот (в маслах) находится в крайних положениях (*sn*-1 и *sn*-3) и легко поддается окислению.

Стерины (стероидные спирты) – это производные циклопентанпергидро-фенантрена, метилированного в 10-м и 13-м положениях. Все стерины содержат β-ОН-группу у третьего углеродного атома и одну или несколько двойных связей в кольце В. Они присутствуют во многих мембранах растений, животных и микроорганизмов, выполняя структурную функцию, а также являясь предшественниками витаминов и гормонов, компонентами желчных кислот и др. Наиболее распространенным стеринем мембран животных клеток является *холестерин*:



Это слабоамфифильная молекула, содержащая жесткое гидрофобное полициклическое ядро и полярную головку, представленную ОН-группой. Холестерин входит в состав мембран (стабилизирует их текучесть) и является предшественником для синтеза стероидных гормонов, желчных кислот, витамина D₃. В клетках растений, водо-

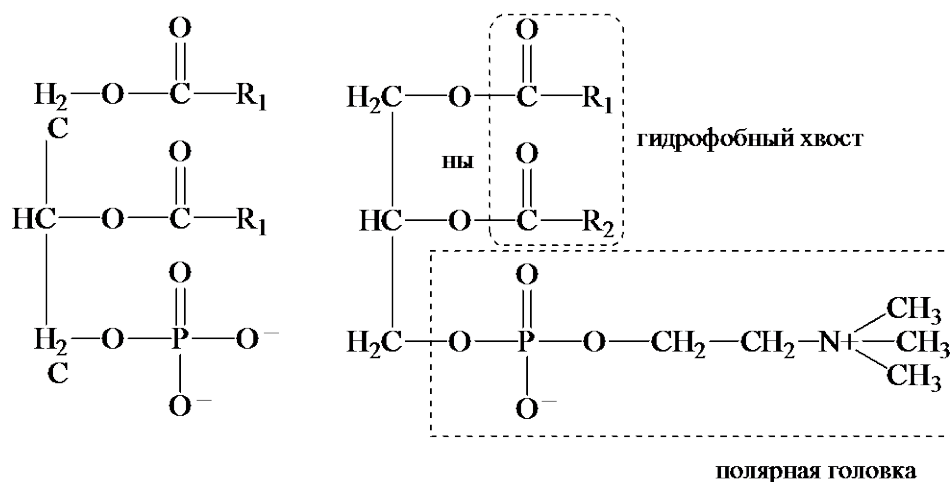
рослей, мицелиальных грибов и дрожжей образуется множество родственных холестерину соединений – эргостерол, β -ситостерол, стигмастерол и др.

Полярные липиды. К ним относятся фосфо- и гликолипиды, которые формируют биомембраны клетки. Среди них выделяют фосфоглицеро-, фосфосфинго-, гликоглицеро- и гликосфинголипиды. Разнообразие представителей этих классов огромно и в любой мембране может содержаться до 100 разных типов липидных молекул, что, очевидно, связано с разнообразием их функций. Однако основной функцией липидов в биомембранах служит структурная – липиды формируют бислой, в котором находятся белковые молекулы.

Фосфоглицеролипиды. Они преобладают в количественном отношении в большинстве биомембран. Наиболее распространены следующие фосфоглицеролипиды: фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, дифосфатидилглицерол (кардиолипин). Основу молекул фосфоглицеролипидов составляет 3-атомный спирт глицерин. Две его ОН-группы этерифицированы двумя остатками жирных кислот, а третья – остатком фосфорной кислоты. Образованная в результате молекула представляет собой основной предшественник всех фосфоглицеролипидов – фосфатидную кислоту, или фосфатидат. В результате реакции этерификации фосфатной группы фосфатидата ОН-группой одного из спиртов (холина, этаноламина) или аминокислоты (серина) образуются соответствующие фосфоглицеролипиды.

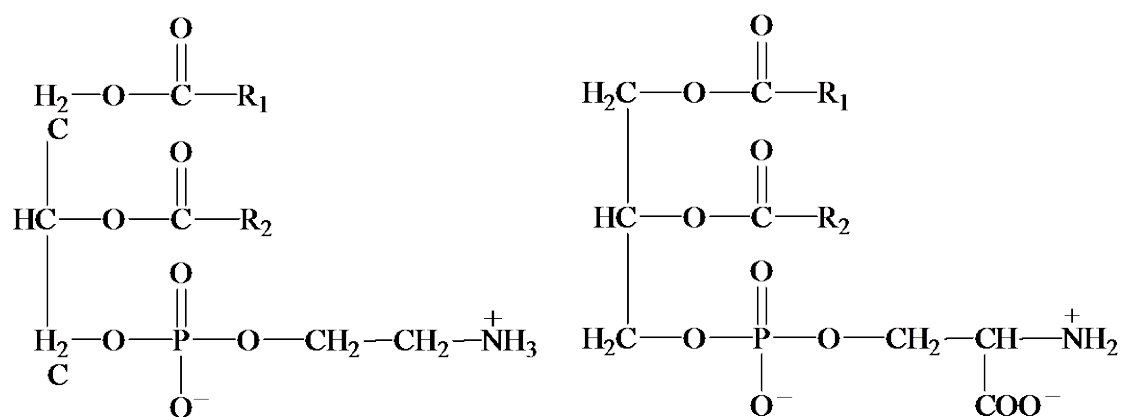
Жирные кислоты в составе фосфоглицеролипидов почти всегда содержат четное число углеродных атомов (14–24). Среди них наиболее распространены пальмитиновая (C16 : 0), пальмитолеиновая (C16 : 1, Δ 9), стеариновая (C18 : 0), олеиновая (C18 : 1, Δ 9), линолевая (C18 : 2, Δ 9,12), линоленовая (C18 : 3, Δ 9,12,15), арахидиновая (C20 : 0), арахидоновая (C20 : 4, Δ 5,8,11,14) кислоты.

Фосфоглицеролипиды выполняют в мембранах структурную функцию. Фосфатидилхолин служит основным компонентом мембран животных клеток, фосфатидилэтаноламин встречается в мембранах бактерий. Это сильноамфифильные молекулы, так как содержат в структуре две неравнозначные по свойствам группировки: полярную гидрофильную головку (остаток фосфорной кислоты с присоединенным к нему аминокспиртом или аминокислотой) и неполярный гидрофобный хвост (остатки жирных кислот):



фосфатиды

фосфатидилхолины



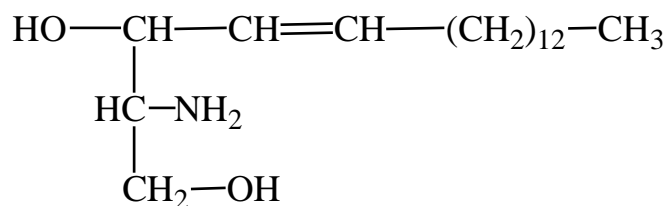
фосфатидилэтаноламины

фосфатидилсерины

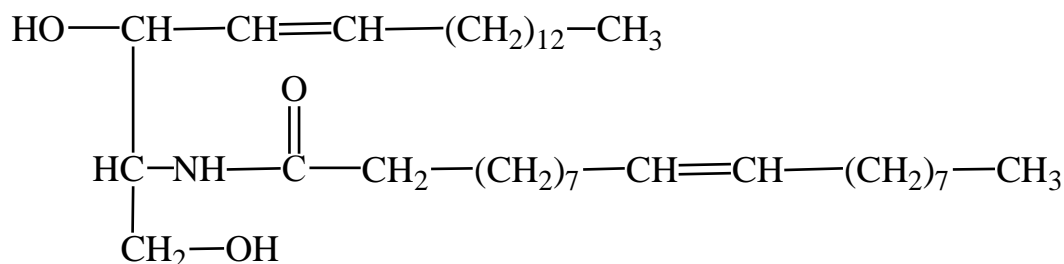
R_1, R_2 – остатки жирных кислот

Фосфосфинголипиды. Это также сильноамфифильные молекулы. Они образованы на основе аминоспирта *сфингозина*, имеющего длинную негидролизуюмую ненасыщенную углеводородную цепь. Первичным сфинголипидом, из которого образуются все классы неглицероловых липидов, является *церамид*, формирующийся в результате присоединения жирной (чаще мононенасыщенной) кислоты к центральной аминогруппе сфингозина с образованием амидной связи.

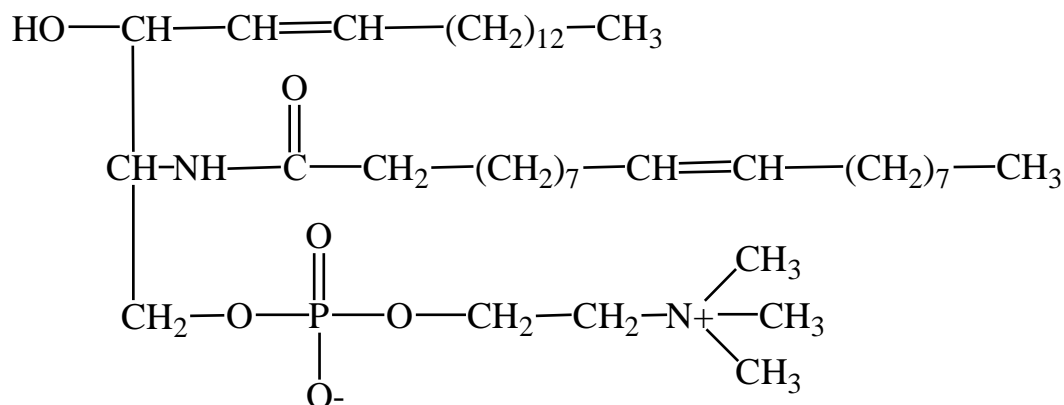
Фосфосфинголипиды представляют собой *церамиды*, у которых оставшаяся ОН-группа этерифицирована фосфатным производным – фосфорилхолином, фосфорилэтаноламином, фосфорилинозитолом, фосфорилглицеролом. Церамид, этерифицированный фосфорилхолином, называется **сфингомиелином**. Он преобладает в мембранах животных клеток, выполняя там в основном структурную функцию.



сфингозин



церамид

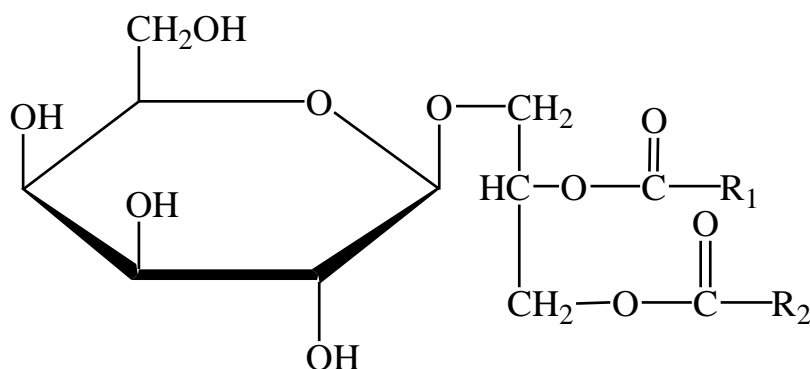


сфингомиелин

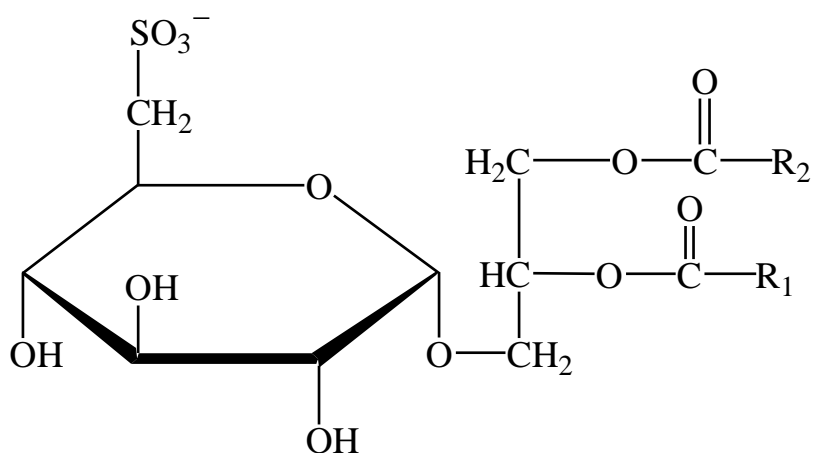
Фосфосфинголипиды служат основными структурными компонентами мембран клеток нервной ткани, формируя миелиновые оболочки нейронов.

Гликоглицеролипиды. Представляют собой полярные липиды, построенные на основе глицерина, у которого ОН-группа у третьего атома углерода участвует в образовании гликозидной связи с каким-либо углеводом. Роль углеводных единиц чаще выполняют остатки галактозы или 6-сульфо-6-дезоксид- α -D-глюкопиранозил, при этом образуются, соответственно, моногалактозилдиацилглицерин и сульфоллипид. Гидроксильные группы двух остальных атомов углерода глицерина в гликоглицеролипидах так же, как в фосфоглицеролипидах, этерифицированы жирными кислотами. Гликоглицеролипиды выпол-

няют в основном рецепторную функцию. На долю моногалактозил-диацилглицерина приходится до половины всех липидов тилакоидных мембран хлоропластов.



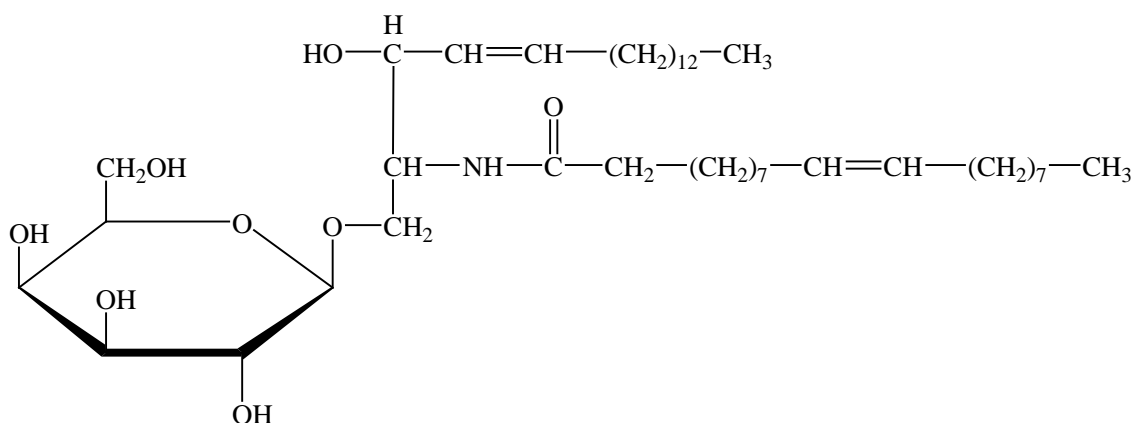
моногалактозилдиацилглицерин



сульфолипид

R_1, R_2 – остатки жирных кислот

Гликофинголипиды. Построены на основе церамида, к концевой ОН-группе которого с помощью гликозидной связи присоединяются моно- либо олигосахариды. Те гликофинголипиды, у которых углеводная часть представлена моносахаридами, называются **цереброзидами**. Сфинголипиды, у которых углеводная часть представлена коротким кислотным, как правило, разветвленным олигосахаридом, называются **ганглиозидами**. Кислотность этого класса гликолипидов обусловлена присутствием в них в качестве ветвей углеводной цепи моносахарида нейраминовой кислоты или ее N-ацетилпроизводного.



Гликофинголипиды являются компонентами мембран клеток нервной ткани, участвуют в регуляции клеточного метаболизма (в регуляции роста клеток), выполняют сигнальные функции, воспринимая и передавая сигналы, т. е. являются молекулами-медиаторами. Гликофинголипиды мембран эритроцитов несут антигены группы крови. Цереброзиды присутствуют в высоких концентрациях в мозге и нервных тканях млекопитающих.

СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА БИОМЕМБРАН

К биомембранам относят плазматические мембраны клеток, ядерную мембрану, мембраны эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи, мембраны лизосом, пероксисом, митохондрий, хлоропластов, суперкапсиды вирусов, а также некоторые специализированные мембраны отдельных организмов. Все они имеют классическую структуру – липидный бислой с вкраплениями белковых молекул, и можно говорить, что принципиально их структурная организация не различается.

Биомембраны выполняют различные функции:

1) ограничивающую: биомембраны окружают все про- и эукариотические клетки, обособливая живое от неживого или отдельные клетки в многоклеточном организме, а также содержимое отдельных оргanelл в эукариотических клетках, что позволяет в каждой из них осуществляться специфическим процессам;

2) барьерную: биомембраны – это высокоизбирательный барьер для большинства веществ, стремящихся попасть в клетку (органеллу) или покинуть ее;

3) обуславливают индивидуальность клеточных поверхностей, что особенно важно для многоклеточных животных организмов, ли-

шенных клеточных стенок. Это позволяет клеткам взаимодействовать между собой, формируя органы и ткани;

4) только на мембранах осуществляются такие процессы запасания энергии, как окислительное и фотофосфорилирование;

5) многие ферментативные реакции осуществляются только в мембранах, и биомембраны воздействуют на активность многих ферментов;

6) только на мембранах осуществляются генерация и перенос нервных импульсов, мембраны обладают рецепторной функцией;

7) обязательного участия мембран требуют такие жизненно важные процессы, как синтез белка, репликация ДНК, модификация и секреция белков, регуляция метаболизма, основанная на гормональном ответе.

Биомембраны представляют собой природные пленки толщиной 5–7 нм, состоящие в основном из липидов (фосфо-, гликолипидов и холестерина), которым принадлежит структурная функция, и белков, определяющих разнообразие мембран и уникальность их свойств. Кроме того, в состав мембран входят углеводы, присутствующие там в составе гликолипидов и гликопротеинов. Для объяснения организации биомембран предложено несколько моделей, из которых общепринятой в настоящее время считается *жидкостно-мозаичная модель* С. Дж. Сингера и Г. Л. Николсона, предложенная в 1971 г. Согласно этой модели (рис. 12), основой мембран служит текучий липидный бислой, в котором остатки жирных кислот фосфолипидов находятся в жидкокристаллическом состоянии. В бислой погружены и встроены молекулы белков, также способные к движению.

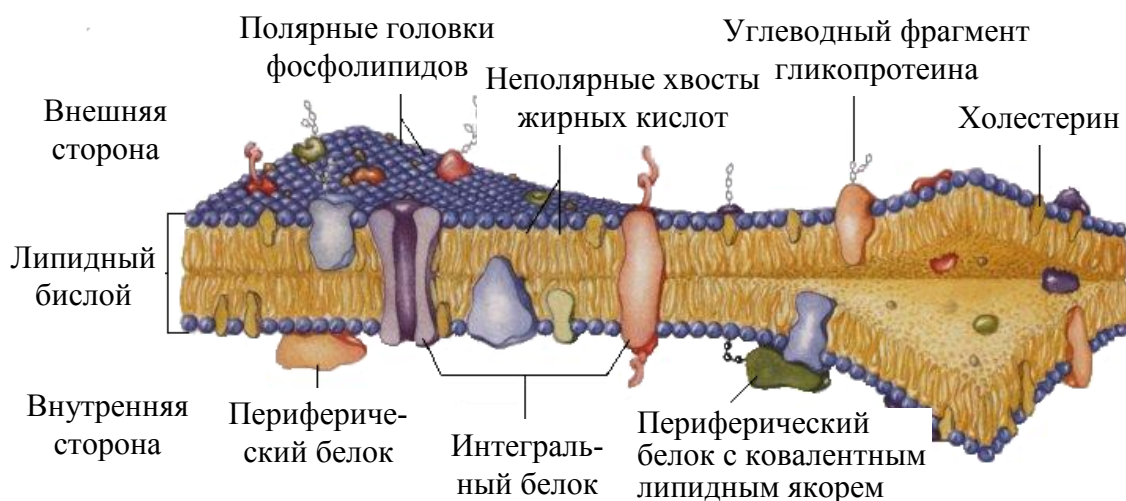


Рис. 12. Строение цитоплазматической мембраны

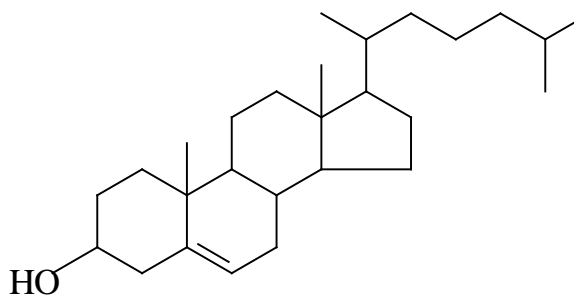
Анализ строения липидов. Процедура выделения липидов из биологического материала включает следующие стадии:

- измельчение биологического материала до гомогенного состояния (гомогенизация);
- перевод липидов в растворенное состояние (экстракция);
- освобождение липидного экстракта от нелипидных примесей;
- разделение водной и органической фаз;
- высушивание липидного экстракта.

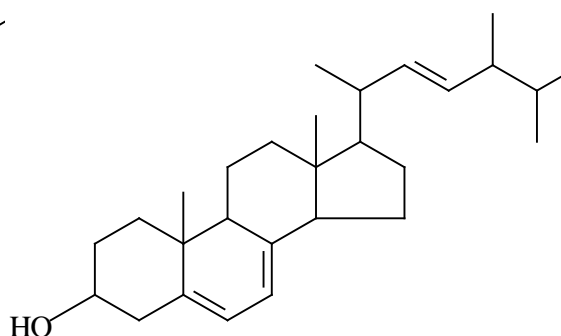
Липиды, выделенные из биологического материала, представляют собой сложную смесь. Наиболее эффективными и широко применяемыми методами качественного и количественного анализа компонентного состава смесей липидов являются методы газо-жидкостной и тонкослойной хроматографии. Последняя применяется только для качественного анализа липидов.

Тема 10. Стероиды

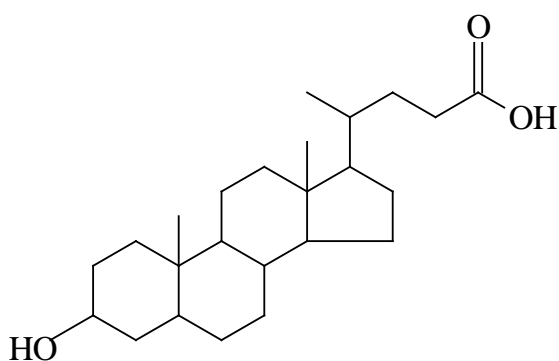
Стероиды – сложные жирорастворимые вещества, молекулы которых содержат в своей основе циклопентанпергидрофенантрен (по своей сути – тритерпен). Основной стерол в тканях животных – спирт холестерин (холестерол). Холестерин и его эфиры с длинноцепочечными жирными кислотами – важные компоненты липопротеинов плазмы, а также наружной клеточной мембраны. Из-за того, что четыре конденсированных кольца создают жесткую структуру, присутствие холестерина в мембранах регулирует текучесть мембран при экстремальных температурах. В растениях и микроорганизмах содержатся родственные соединения – эргостерин, стигмастерин и β -ситостерин.



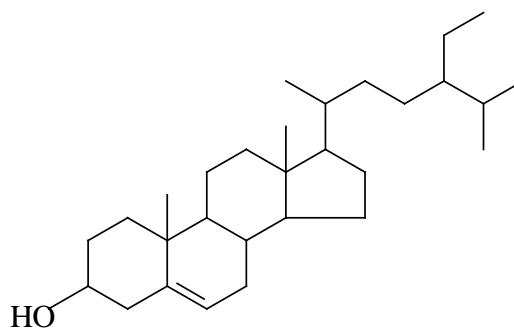
холестерин



эргостерин

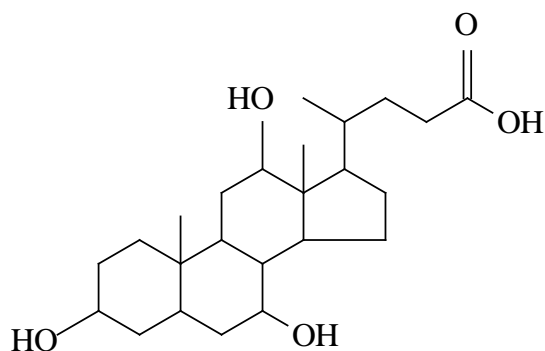


стигмастерин



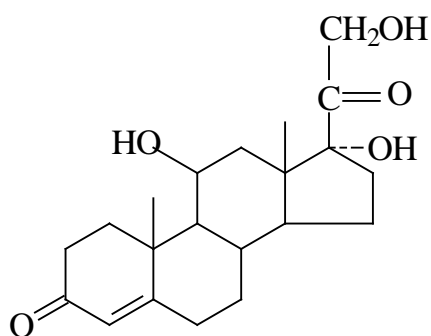
β -ситостерин

Из холестерина в организме образуются желчные кислоты. Они обеспечивают растворимость холестерина в желчи и способствуют перевариванию липидов в кишечнике.

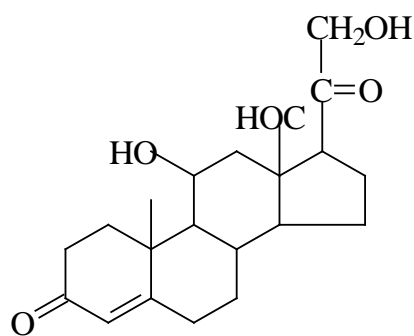


холевая кислота

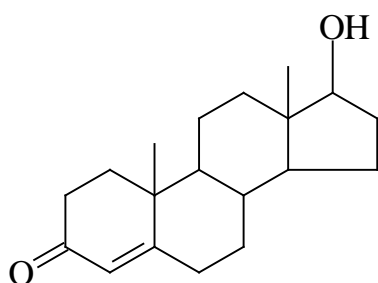
Из холестерина образуются также стероидные гормоны – липофильные сигнальные молекулы, регулирующие обмен веществ, рост и репродукцию. В организме человека основными являются шесть стероидных гормонов.



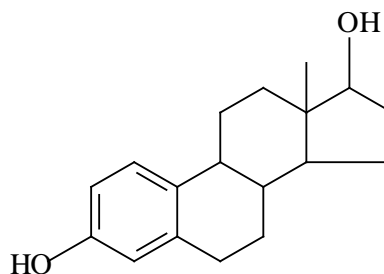
кортизол



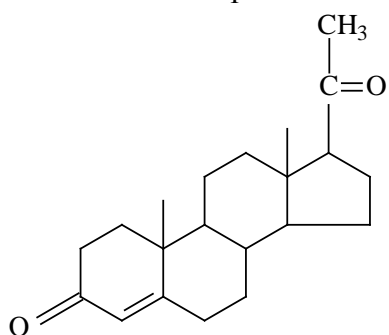
альдостерон



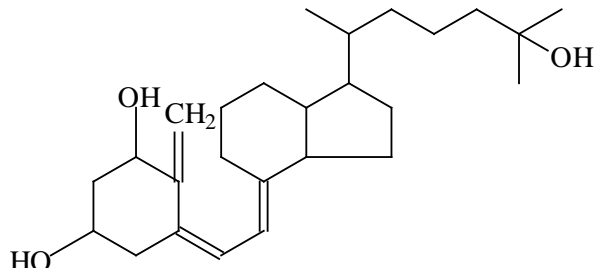
тестостерон



эстрадиол



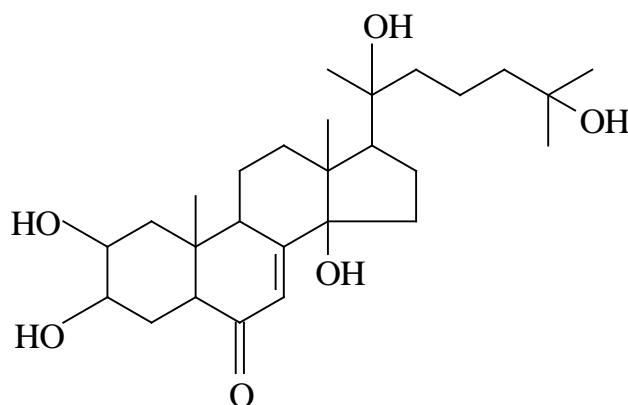
прогестерон



кальцитриол

Кальцитриол – витамин D, обладающий гормональной активностью, он отличается от гормонов позвоночных, однако также построен на основе холестерина. Кольцо В раскрывается за счет светозависимой реакции.

Производным холестерина является гормон линьки насекомых, пауков и ракообразных – экдизон.



экдизон

Стероидные гормоны, выполняющие сигнальную функцию, встречаются также в растениях.

Тема 11. Витамины

Витамины – это низкомолекулярные органические соединения, выполняющие в организме человека жизненно важные функции, чаще каталитические и регуляторные.

Большинство витаминов не может накапливаться или синтезироваться в организмах человека и животных, поэтому они должны поступать с пищей. Синтезируются витамины в клетках растений и микроорганизмов, а некоторые из них вырабатываются в ограниченном количестве микрофлорой кишечника. Витамины проявляют активность в малых количествах, но с ними связаны многие метаболические процессы, которые протекают при участии ферментов. Витамины, поступающие в организм человека с пищей, в большинстве случаев идентичны коферментам или структурно близки им. Это говорит об участии большинства витаминов в ферментативных реакциях в качестве кофакторов ферментов (коферментная функция).

Обеспеченность организма витаминами выражается в трех формах:

- 1) авитаминоз – полный дефицит какого-либо витамина;
- 2) гиповитаминоз – частичный дефицит одного или нескольких витаминов;
- 3) гипервитаминоз – избыток какого-либо витамина.

В связи с тем что большинство витаминов относится к разным классам органических соединений, их классифицируют в соответствии со способностью растворяться в воде или неполярных органических растворителях. По этому признаку витамины делят на две группы: водо- и жирорастворимые. Кроме того, витамины классифицируют по физиологическому действию на организм.

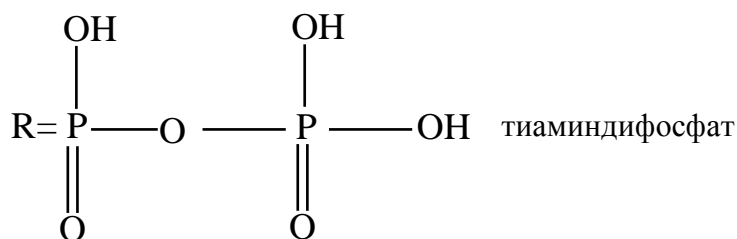
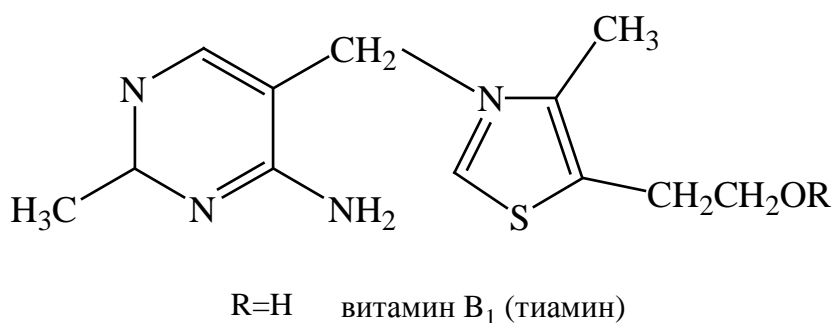
Номенклатура витаминов основана на использовании названий, отражающих химическую природу и функцию витаминов, а также заглавных букв латинского алфавита.

Помимо витаминов, выделяют еще одну группу веществ витаминной природы – витаминоподобные вещества. К ним относятся соединения, которые не являются обязательными компонентами пищи и их дефицит не сопровождается характерными, четко выраженными симптомами. Это холин, липоевая, оротовая и пангамовая кислоты, витамин U, инозит, карнитин.

ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

Большинство водорастворимых витаминов относятся к группе В и обладают коферментными функциями (входят в состав коферментов и простетических групп). Некоферментные свойства витаминов характеризуются способностью участвовать в регуляции метаболизма, проявлять антимуtagenное действие, усиливать защитные свойства организма, повышать свертываемость крови и др.

Витамин В₁ (тиамин). Молекула тиамина состоит из пиримидинового и тиазолового колец, соединенных метиленовой группой.

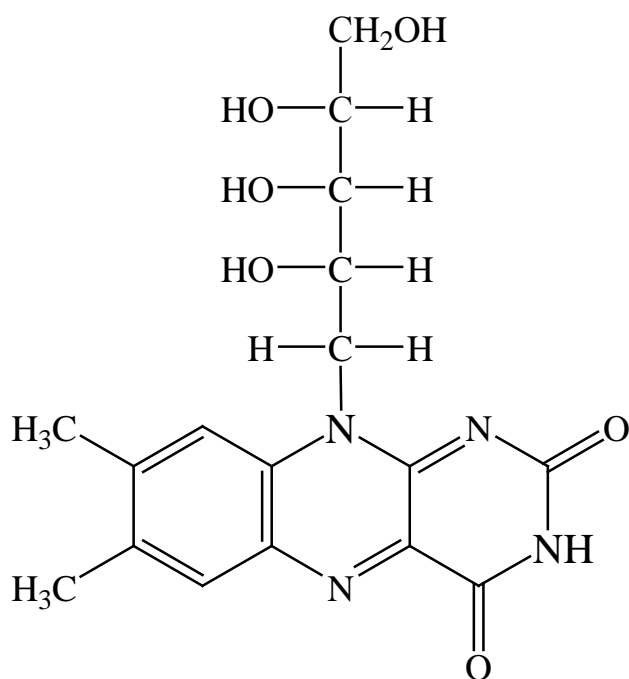


Коферментной формой витамина является тиаминдифосфат (тиаминпирофосфат), который участвует в двух важнейших реакциях:

1) в составе декарбоксилаз кетокислот обеспечивает окислительное декарбоксилирование α-кетокислот (пирувата, α-кетоглутарата, кетоаналогов аминокислот);

2) в составе транскетолаз, катализирующих реакции переноса альдегидной группы, осуществляет транскетолазные реакции пентозофосфатных путей и цикла Кальвина.

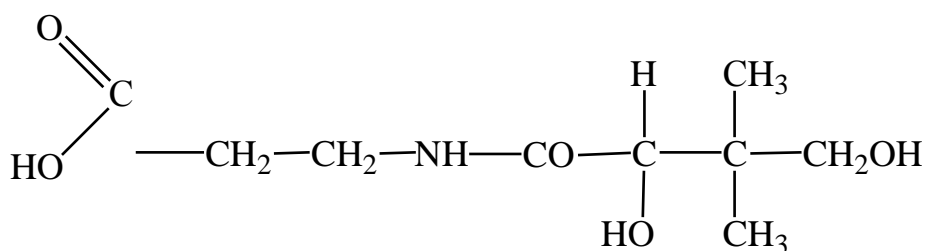
Витамин В₂ (рибофлавин). Молекула рибофлавина представляет собой гетероциклическое соединение изоаллоксазин (сочетание бензольного, пиазинового и пиримидиновых колец), к которому присоединен 5-атомный спирт – рибитол.



витамин В₂

Коферментными формами витамина являются ФАД и ФМН, структура которых приведена ранее. Флавиновые коферменты служат переносчиками восстановительных эквивалентов и входят в состав дегидрогеназ и оксидаз, катализирующих различные окислительно-восстановительные реакции. ФМН синтезируется из свободного рибофлавина и АТФ, а ФАД – из ФМН и АТФ при участии соответствующих ферментов.

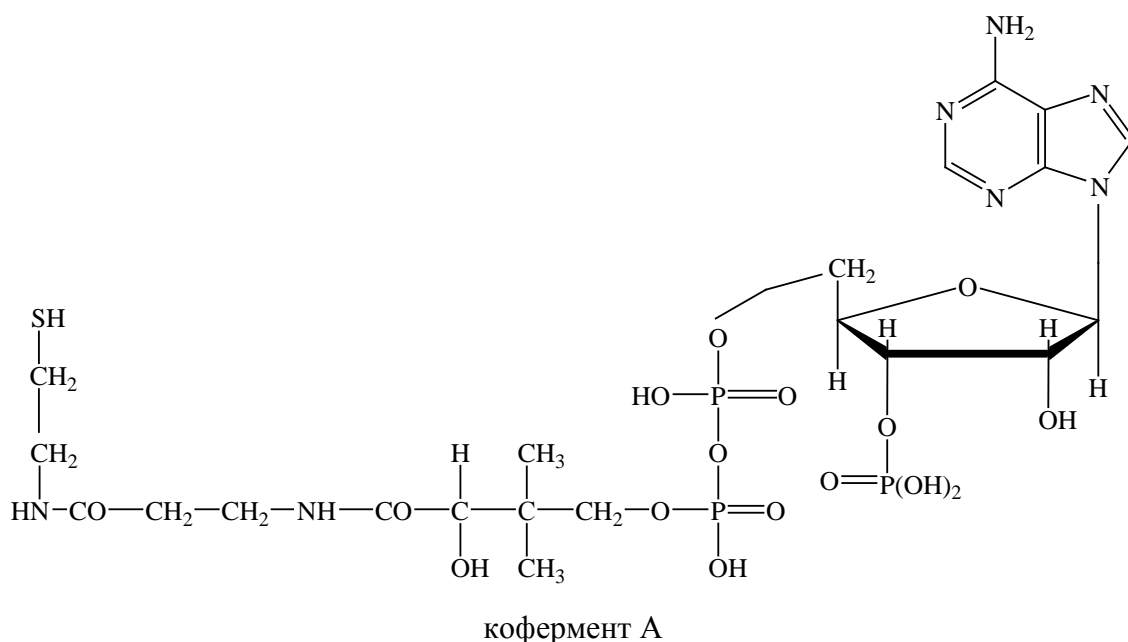
Витамин В₃ (пантотеновая кислота). Коферментной формой витамина является кофермент А, или коэнзим А (CoA). Это соединение служит коферментом ацилпереносящих ферментов, принимающих участие в реакциях цикла трикарбоновых кислот, β-окисления жирных кислот и др.



витамин В₃

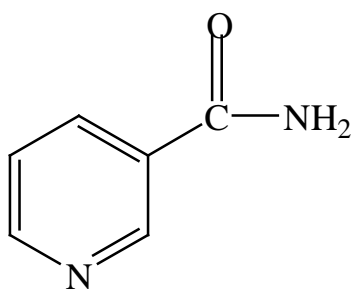
Реакционноспособной группой кофермента А служит сульфгидрильная (–SH) группа, расположенная на конце длинной, относитель-

но гибкой цепи. По этой группе с помощью тиоэфирной связи осуществляется присоединение ацильных остатков. Образующиеся в результате производные носят название ацил-СоА. Простейшим ацильным производным является ацетил-СоА, который характеризуется высоким потенциалом переноса ацетильной группы. Он занимает центральное место в реакциях метаболизма углеводов, аминокислот и жирных кислот.

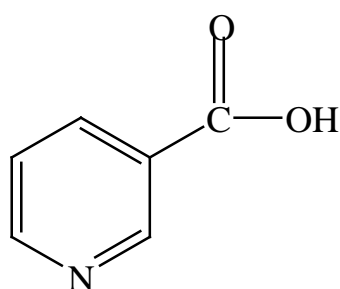


Витамин В₅ (никотинамид, никотиновая кислота, витамин РР).

В природе витамин В₅ встречается в двух формах: в виде никотиновой кислоты и никотинамида, представляющих собой соединения пиридинового ряда.



никотинамид

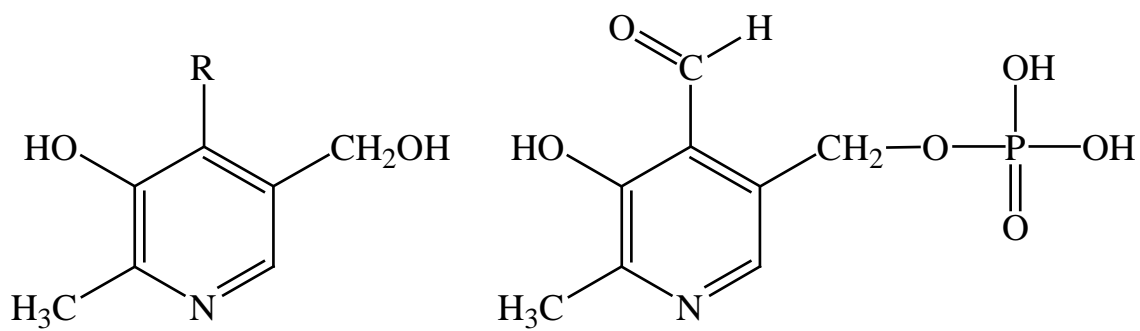


никотиновая кислота

Коферментными формами витамина являются НАД⁺ и НАДФ⁺, структура которых приведена ранее. Никотинамидные коферменты

служат переносчиками восстановительных эквивалентов и входят в состав дегидрогеназ, катализирующих различные окислительно-восстановительные реакции.

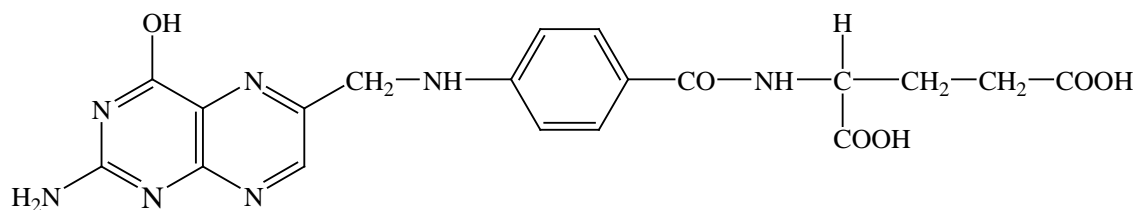
Витамин B₆ (пиридоксин). Он включает три производных пиридина: пиридоксаль, пиридоксин и пиридоксамин. Каждое из этих соединений способно превращаться в коферментную форму – пиридоксальфосфат. Он входит в состав аминотрансфераз, катализирующих реакции трансаминирования аминокислот. При участии пиридоксальфосфат-зависимых декарбоксилаз происходит декарбоксилирование аминокислот. Коферментные функции пиридоксальфосфата проявляются также в реакциях дезаминирования, изомеризации и синтеза аминокислот, фосфорилирования углеводов, метаболизма жирных кислот и липидов.



R=CH₂OH пиридоксин
R=CHO пиридоксаль
R=CH₂NH₂ пиридоксамин

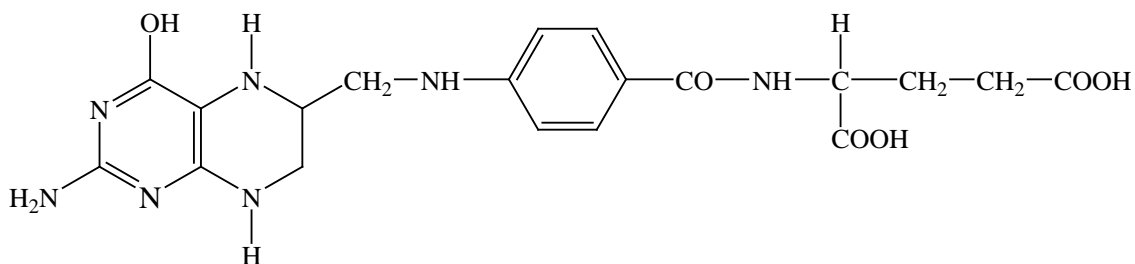
пиридоксальфосфат

Витамин B₉ (фолиевая кислота). Представляет собой птероил-моно-глутаминовую кислоту, которая состоит из производного птеридина, п-аминобензойной и глутаминовой кислот.



фолиевая кислота

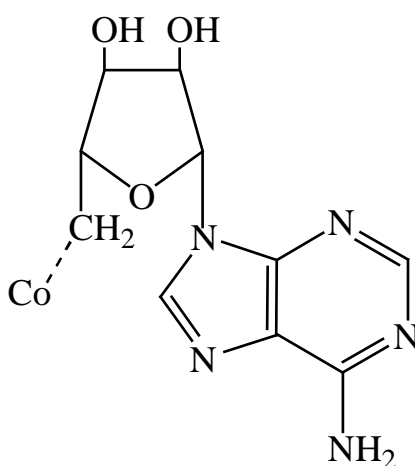
Коферментной формой фолиевой кислоты является тетрагидрофолиевая, которая осуществляет перенос одноуглеродных фрагментов.



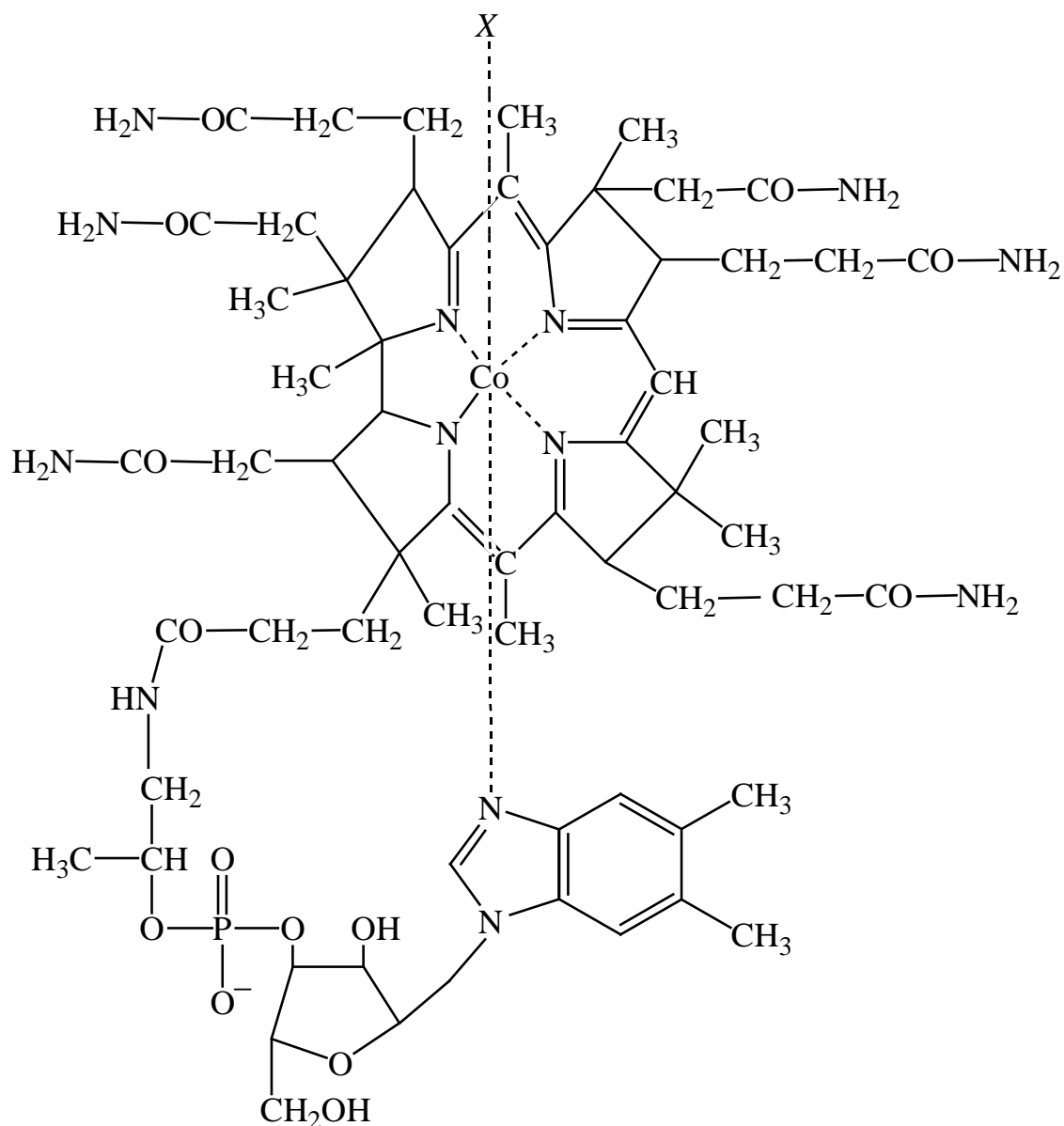
тетрагидрофолиевая кислота

Витамин B_{12} (кобаламин). Это единственный металлсодержащий витамин. Группа кобаламинов представляет собой сложные соединения, состоящие из следующих частей: атома кобальта, двух связанных с кобальтом лигандов (верхнего и нижнего), тетрапиррольного кольца коррина и аминопропанолового мостика.

Атом кобальта связан с четырьмя атомами азота пиррольных колец, которые образуют планарную структуру. Верхний лиганд X может быть представлен цианид-ионом (цианкобаламин), гидроксильной группой (гидрокси кобаламин), ионами нитрита, нитрата, хлора и др. Нижний лиганд представлен нуклеотидом, состоящим из 5,6-диметилбензимидазола, остатков α -D-рибозы и фосфорной кислоты и расположенным перпендикулярно плоскости коррина. Нуклеотид через аминопропаноловый мостик связан в цикл с заместителем атома углерода одного из пиррольных колец.



5'-дезоксиаденозин

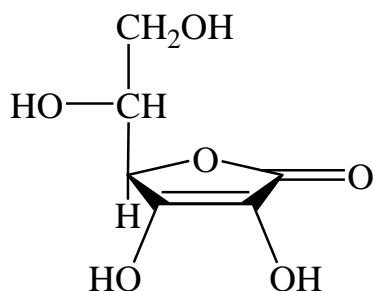


витамин B₁₂

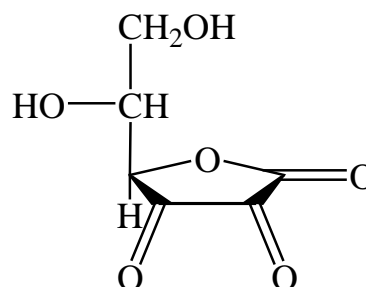
Коферментной формой витамина является 5'-дезоксиаденозил-кобаламин (кобамамидный кофермент), у которого верхний лиганд представлен остатком 5'-дезоксиаденозина, связанного с атомом кобальта необычной кобальт-углеродной связью.

Биохимические функции аденозилкобаламина состоят в изомеризации соединений, имеющей место в углеводном, азотистом, нуклеиновом и липидном обмене, в биосинтезе метионина из гомоцистеина, восстановлении рибонуклеотидов до дезоксирибонуклеотидов и других процессах.

Витамин С (аскорбиновая кислота). Представляет собой γ -лактон 2,3-дегидро-*L*-гулоновой кислоты. Молекула витамина имеет четыре оптических изомера. Биологически активным соединением является только *L*-аскорбиновая кислота, которая в организме присутствует также и в виде окисленной формы – *L*-дегидроаскорбиновой кислоты (2,3-дикето-*L*-гулоновой кислоты), служащей транспортной формой витамина.



L-аскорбиновая кислота

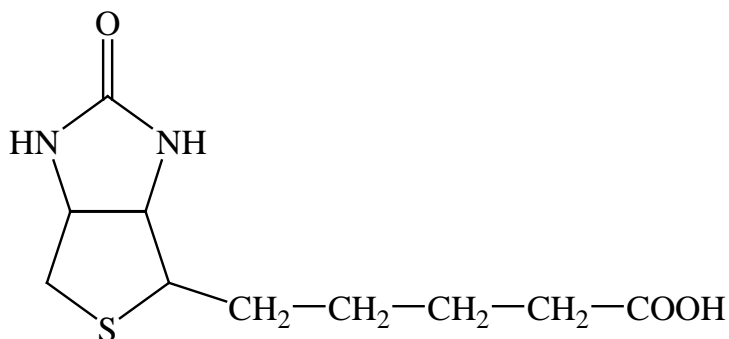


L-дегидроаскорбиновая кислота

Одним из основных свойств аскорбиновой кислоты является ее способность к обратимым окислительно-восстановительным превращениям, которая лежит в основе физиологической активности витамина: *L*-аскорбиновая кислота – сильный восстановитель, а образующаяся при этом *L*-дегидроаскорбиновая кислота легко восстанавливается с помощью редуктазы. Среди множества реакций, протекающих с участием витамина С, можно упомянуть гидроксилирование предшественников некоторых гормонов, синтез коллагена и желчных кислот, расщепление тирозина и лизина и др.

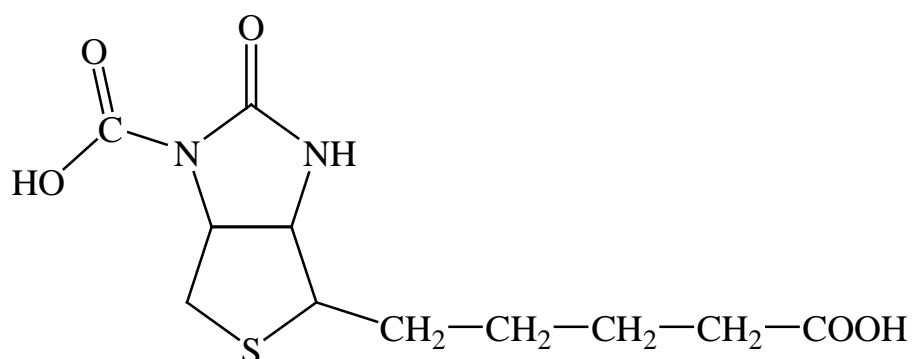
Аскорбиновая кислота служит сильным антиоксидантом, предохраняющим биологически активные вещества клетки от действия свободных радикалов, а также увеличивает всасывание железа и ингибирует образование нитрозаминов (канцерогенов).

Витамин Н (биотин). Молекула биотина состоит из имидазольного и тиюфенового колец, являющихся гетероциклической частью, а боковая цепь представлена остатком валериановой кислоты.



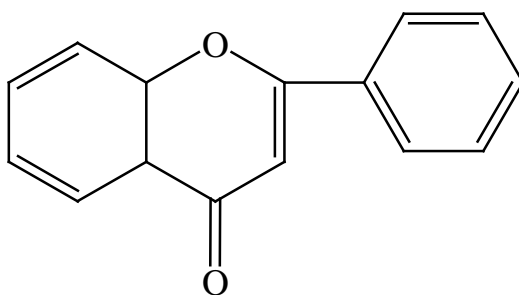
биотин

Коферментной формой биотина служит N₅-карбоксибиотин («активный карбоксил»), который ковалентно связан с белковой частью фермента:



Биотин служит простетической группой ферментов карбоксилаз, катализирующих реакции переноса карбоксильной группы, которые лежат в основе биосинтеза жирных кислот, превращения пирувата в оксалоацетат, синтеза пуриновых оснований, аминокислот и других процессов.

Витамин Р (биофлавоноиды). Это группа соединений фенольной природы, представляющих собой производные флавона. К ним относятся рутин, кверцетин, цитрин, катехины, кумарины, галловая кислота и ее производные.



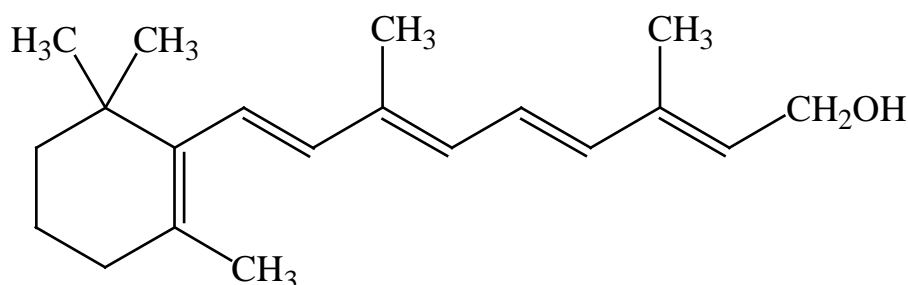
флаван

Биологическое действие биофлавоноидов обусловлено их взаимосвязью с аскорбиновой кислотой. Они препятствуют окислению *L*-аскорбиновой кислоты в *L*-дегидроаскорбиновую, а также восстанавливают последнюю при участии глутатиона. Витамин Р регулирует проницаемость и повышает прочность кровеносных капилляров, а также обладает антиоксидантным и противоопухолевым действием.

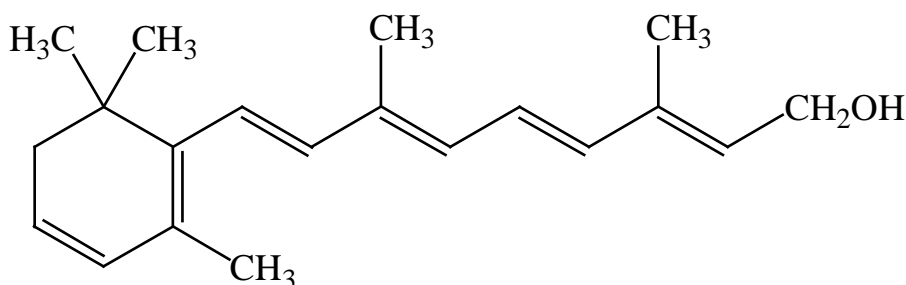
ЖИРОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

По химической структуре все жирорастворимые витамины, за исключением витамина F, являются изопреноидами (терпенами). Это обширная группа соединений, к которой также относятся каротиноиды, стерины, каучук и др. Жирорастворимые витамины выполняют в организме некоферментные функции.

Витамин А (ретинол). Этот витамин существует в двух формах, сходных по химическому строению и обладающих разным физиологическим действием, – ретинол (витамин А₁) и дегидроретинол (витамин А₂). Витамин А, легко окисляясь, дает начало группе ретиноидов, к которой принадлежат ретиналь и ретиноевая кислота. Предшественником биосинтеза витамина А служит β-каротин, при расщеплении одной молекулы которого образуются две молекулы ретинола.



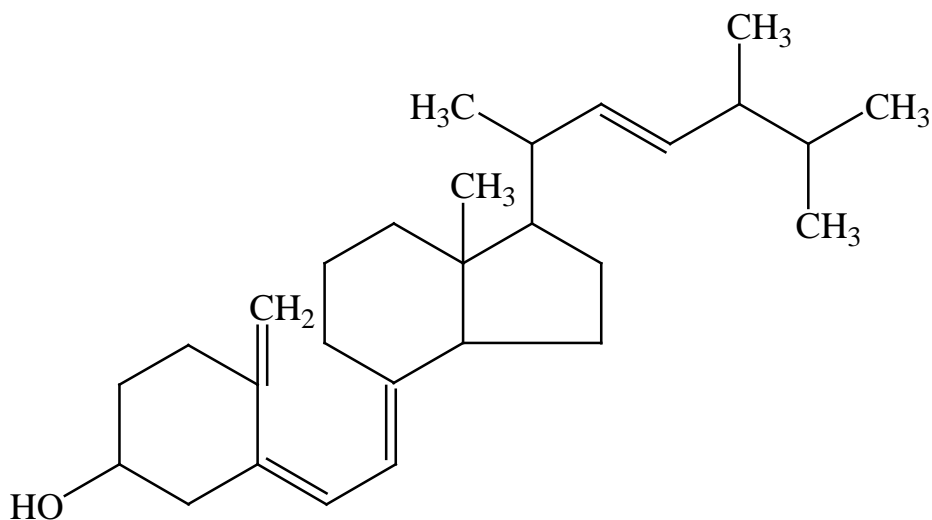
витамин А₁ (ретинол)



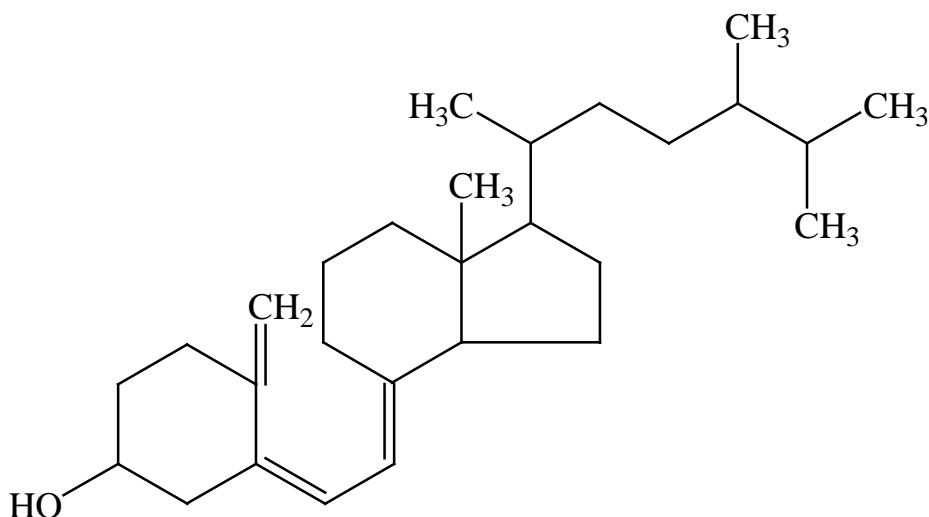
витамин А₂ (дегидроретинол)

Биологическая роль витамина А и его форм состоит в регуляции дифференцировки клеток, предупреждении ороговения эпителиальных тканей, осуществлении репродуктивной функции, участии в обмене белков и липидов, окислительных процессах, регуляции проницаемости мембран. Ретиналь выполняет роль зрительного пигмента. Кроме того, ретиноиды обладают антиопухолевой активностью и ослабляют действие канцерогенов. β-Каротин является антиоксидантом.

Витамин D (кальциферол). Кальциферол, как и витамин А, существует в нескольких формах. Важнейшие среди них – эргокальциферол (витамин D₂) и холекальциферол (витамин D₃).



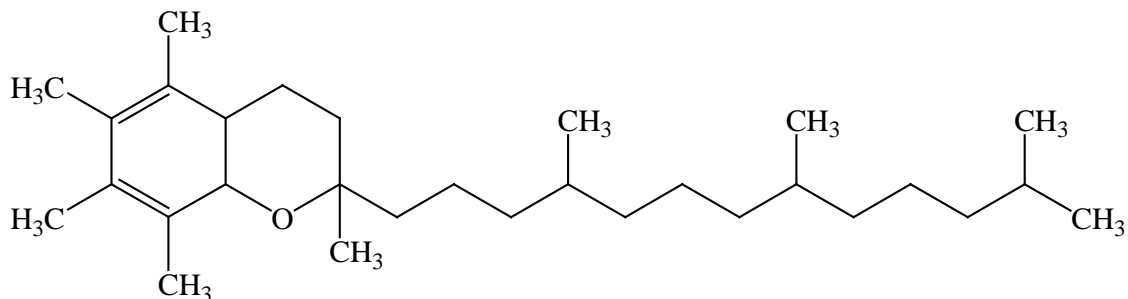
витамин D₂



витамин D₃

Основные функции витамина D в организме связаны с обеспечением транспорта ионов кальция и фосфора через биомембраны. Причем, витамин D выполняет свои функции в форме образующихся из эрго- и холекальциферола активных метаболитов, важнейшим из которых является 1,25-дигидроксихолекальциферол (кальцитриол). Последний стимулирует всасывание кальция в желудочно-кишечном тракте и включение его в костную ткань.

Витамин Е (токоферол). Под этим названием объединяется группа соединений – производных токола. Наиболее распространены α -, β - и γ -токоферолы, которые различаются числом и положением метильных групп у бензольного кольца.

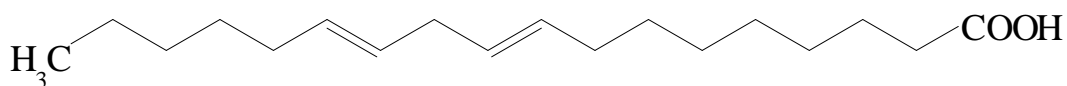


α -токоферол

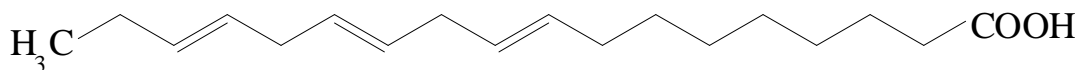
Витамин Е обладает антиоксидантным действием, препятствуя процессам перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот в составе липидов клеточных мембран. Кроме того, токоферолы участвуют в регуляции синтеза ферментов, контролируют обмен и функции убихинона (кофермента Q) – одного из компонентов дыхательной цепи, а также являются синергистами селена.

Витамин F (эссенциальные жирные кислоты). Эссенциальными (незаменимыми) жирными кислотами называются жирные кислоты, которые не могут быть синтезированы в организме человека и животных в количествах, необходимых для их нормального роста и развития, и должны поступать с пищей. К ним относятся полиненасыщенные жирные кислоты, содержащие 18 атомов углерода: линолевая (C18 : 2) и α -линоленовая (C18 : 3).

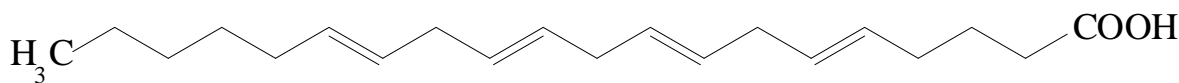
Из линолевой и линоленовой кислот может образовываться арахидоновая кислота, которая служит предшественником большой группы медиаторов – эйкозаноидов. Последние участвуют в высвобождении веществ внутриклеточного синтеза, контролируют сокращение гладкомышечной ткани, оказывают влияние на метаболизм костной ткани, нервную и иммунную системы и др. Следует отметить участие витамина F в регуляции обмена липидов, а также его роль в выведении из организма избыточных количеств холестерина.



линолевая кислота



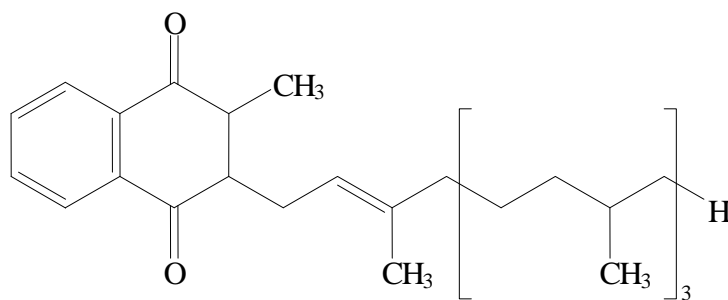
линоленовая кислота



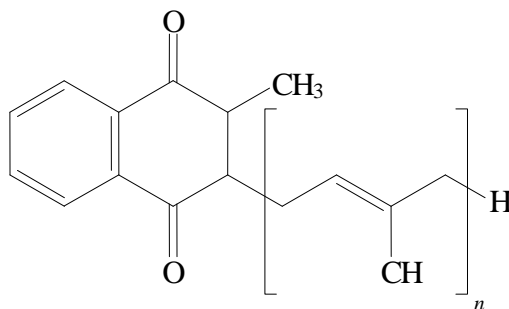
арахидоновая кислота

Витамин К (филлохинон). Витамины этой группы являются производными 2-метил-1,4-нафтохинона и представлены филлохинонами (витамин К₁) и менахинонами (витамин К₂), отличающимися строением боковой цепи.

Витамин К характеризуется антигеморрагической активностью, стимулируя биосинтез факторов свертывания крови. При этом филлохинон как кофактор карбоксилазы принимает участие в карбоксилировании остатков глутаминовой кислоты белков плазмы крови (протромбина и др.). Менахиноны функционируют в составе мембран, а также участвуют в окислительном фосфорилировании и фотофосфорилировании.



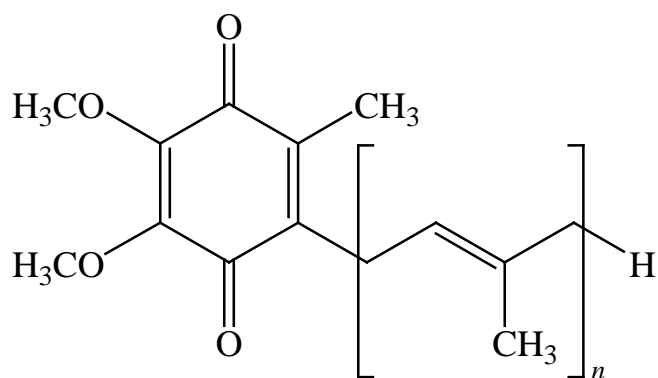
витамин К₁



витамин К₂

Витамин Q (убихинон). Относится к семейству хинонов, среди которых наиболее распространены убихиноны, называемые также ко-

ферментами Q. Они участвуют в процессах транспорта электронов при дыхании и фотосинтезе, а также проявляют антиоксидантное действие в мембранах, причем еще более эффективное, чем у токоферола.



витамин Q (убихинон)

Тема 12. Введение в фармакологию. Фармакокинетика

Фармакология (от греч. *pharmakon* – лекарство, яд; *logos* – учение) – наука о взаимодействии лекарственных веществ и организма. Основными задачами фармакологии являются создание, и обоснование рационального применения новых лекарственных средств, и изучение новых свойств уже известных лекарственных препаратов. Термин «лекарство» является производным французского слова *drogue* (сухая трава), и под термином «лекарство» подразумевают любое вещество, которое может быть использовано с целью:

- диагностики;
- профилактики;
- облегчения или лечения заболеваний человека или животного;
- регуляции рождаемости.

По определению ВОЗ лекарственным является любое вещество или продукт, который может быть использован или используется для исследования изменения физиологических систем или патологических процессов с пользой для реципиента.

Фармакология – бурно прогрессирующая наука. Прогресс в области лекарствоведения и фармакологии в целом привел к тому, что в последнее время выделился и обособился ряд самостоятельных научных дисциплин и направлений. Синтез отдельных веществ, затем групп соединений создал предпосылки к выделению отдельных направлений лекарственной терапии и профилактики, таких, например, как радиационная фармакология, иммунофармакология, психофармакология, педиатрическая фармакология и др.

В целом же в настоящее время фармакология как базовая наука имеет четыре основных раздела:

- 1) фармакокинетика;
- 2) фармакодинамика;
- 3) фармакотерапия;
- 4) токсикология лекарств (нежелательное действие лекарств).

Кроме того, фармакологию еще подразделяют на общую и частную. Если **общая фармакология** изучает общие закономерности взаимодействия лекарственных веществ с живыми организмами, то **частная** рассматривает конкретные фармакологические группы и отдельные препараты.

В обоих разделах особое внимание уделяется фармакодинамике и фармакокинетике лекарств, приводятся сведения о показаниях к их применению и возможных побочных эффектах.

Фармакокинетика (ФК) (от греч. *pharmakon* – лекарство, яд; *kineo* – двигать) – это один из основных разделов фармакологии, изучающий движение лекарств, а именно: в количественном плане описывает (характеризует) абсорбцию (всасывание), распределение, биотрансформацию и экскрецию (выведение) лекарственных средств из организма. Другими словами, ФК изучает пути прохождения и изменения лекарственных средств в организме, а также, что очень важно подчеркнуть, зависимость от этих процессов эффективности и переносимости препаратов. Фармакокинетика позволяет изучить динамику концентрации лекарственных средств в организме. Фармакокинетические исследования позволяют оценить процессы всасывания (абсорбции), распределения, связывания с белками, биотрансформации и выведения из организма лекарственных средств. Полученные в результате этих исследований данные создают ту качественную и количественную основу, с помощью которой можно прогнозировать степень попадания лекарственного вещества к месту его действия.

Фармакодинамика (ФД) – это раздел фармакологии, изучающий:

1) механизмы действия, т. е. сущность процессов взаимодействия с тканевыми, клеточными или субклеточными рецепторами – специфическими или неспецифическими;

2) фармакологические эффекты, т. е. содержание и изменение влияния препарата в зависимости от возраста, пола больного, характера и течения заболевания, сопутствующей патологии;

3) локализацию действия лекарств. Более коротко ФД можно определить как раздел фармакологии, изучающий действие лекарственных средств на организм.

НОМЕНКЛАТУРА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Многие лекарственные средства (ЛС), состоящие из одного активного вещества, могут быть названы по их химическому строению. Но в связи с большой сложностью запоминания и неудобством применения химические названия в медицинской практике не используются.

В настоящее время для обозначения лекарственных средств используют два вида названий:

1) непатентованные международные, которые утверждаются официальными органами здравоохранения и используются в национальных и международных фармакопеях;

2) коммерческие, или фирменные, названия, являющиеся коммерческой собственностью фармфирм. При этом один и тот же препарат может иметь множество названий. Транквилизатор диазепам имеет фирменные названия «седуксен», «сибазон», «реланиум» и т. д. Некоторые ЛС имеют более 100 наименований (например, витамин В₁₂). Обычно на упаковке лекарственного препарата указывают как фирменное, так и международное непатентованное название.

Для клиницистов наиболее удобной классификацией лекарств является та, что строится по **нозологическому принципу** (например, средства для лечения бронхиальной астмы, инфаркта миокарда, антидиабетические препараты и т. п.). Но лучшие классификации учитывают такие признаки препаратов, как локализация действия, фармакологическое действие, терапевтическое применение. Одной из таких наиболее совершенных классификаций является предложенная академиком М. Д. Машковским, согласно которой изложен и его известный справочник.

Лекарство – это вещество, применяемое с целью лечения какого-либо заболевания или для его профилактики.

Лекарственное вещество – это одно вещество или смесь веществ природного или синтетического происхождения.

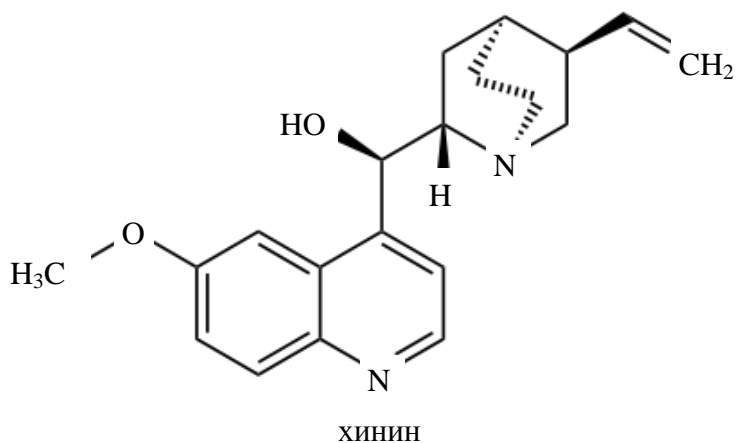
Лекарственный препарат – это лекарственное средство в готовом для применения виде.

Лекарственная форма – это лекарственное вещество в наиболее удобной для приема больным форме.

Тема 13. Противомаларийные препараты

Возбудителями малярии являются открытые в 1880 г. простейшие – малярийные плазмодии, которые переносятся особым видом комара *Anopheles*.

Хинин ($C_{20}H_{24}N_2O_2$) – основной алкалоид коры хинного дерева с сильным горьким вкусом, обладающий жаропонижающим и обезболивающим свойствами, а также выраженным действием против малярийных плазмодиев. Это позволило в течение длительного времени использовать хинин как основное средство лечения малярии. Сегодня с этой целью употребляют более эффективные синтетические препараты, но по ряду причин хинин находит свое применение и в настоящее время.

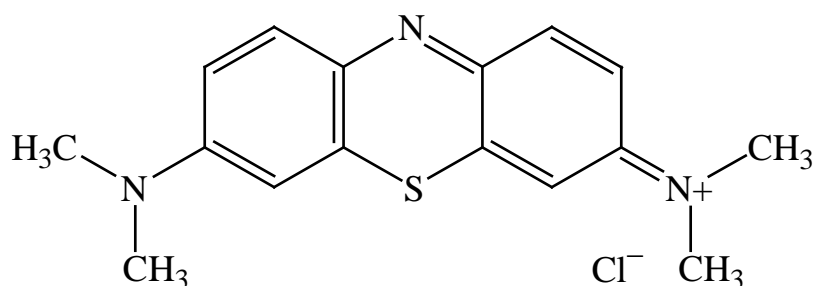


С фармакологической точки зрения хинин представляет собой антибиотик. Он эффективно убивает гаметоцитные формы *Plasmodium vivax* и *P. malaria* (но не *P. falciparum*) в эритроцитах, причем и механизм его биологической активности, который заключается в избирательном подавлении репликации ДНК и транскрипции РНК, типичен для антибиотиков. Ограниченное применение хинин находит также для лечения некоторых сердечных заболеваний и в акушерской практике.

Ввиду сложности строения и высокой коммерческой стоимости хинина уже в начале XX века предпринимались попытки получения его синтетических аналогов с противомаларийной активностью.

Используя метиленовую синь для прокраски животных тканей при гистологических исследованиях, П. Эрлих обратил внимание на то, что малярийный плазмодий окрашивается ею высокоселективно. Это дало ему основание уже в 1891 г. рекомендовать метиленовую синь для широких клинических испытаний в качестве противомаларийного препарата.

рийного препарата и синтезировать ряд синтетических аналогов с целью выяснения связи между их строением и противопротозойной активностью.

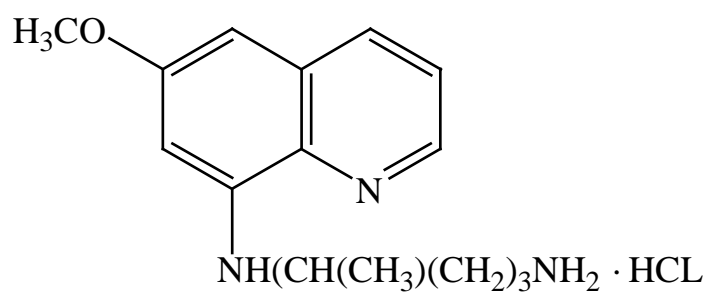


метиленовый синий

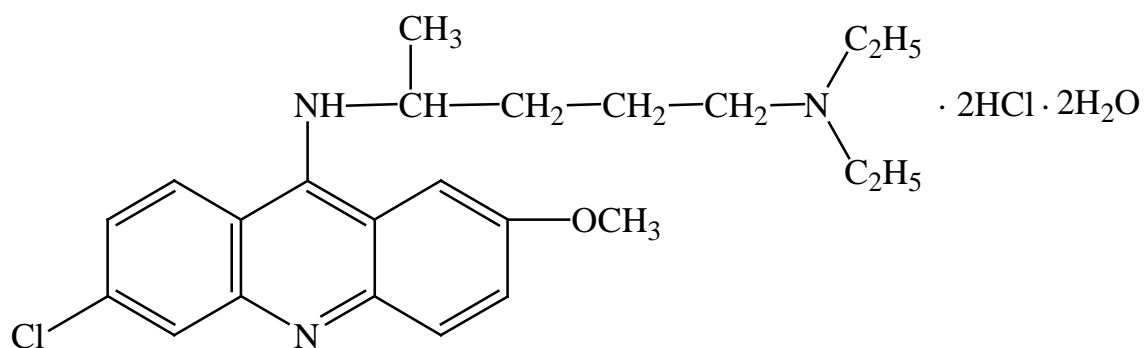
Принято считать, что работы П. Эрлиха по синтетическим противомаларийным средствам, в первую очередь по метиленовой сини и ее аналогам, а также ряд исследований в других направлениях означали рождение современной химиотерапии.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОТИВОМАЛАРИЙНЫЕ ПРЕПАРАТЫ

Наиболее распространенными современными синтетическими противомаларийными препаратами в настоящее время являются примахин (синтезирован в Германии) и акрихин.



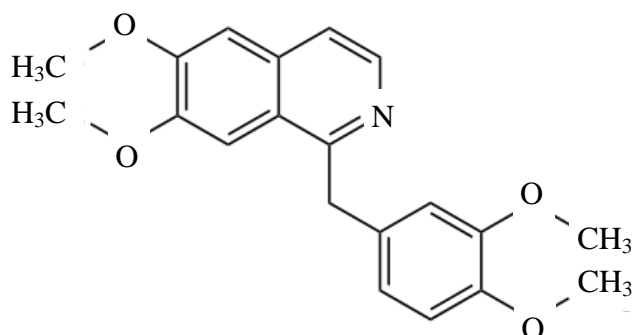
примахин



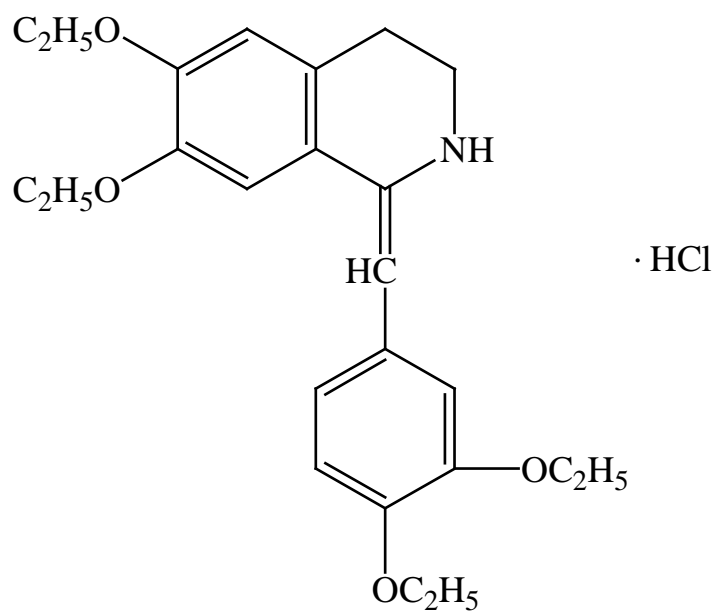
акрихин

АНАЛЬГЕТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ (ГРУППА АЛКАЛОИДОВ)

Папаверин – опиумный алкалоид, производное изохинолина, лекарственное средство спазмолитического и гипотензивного действия:



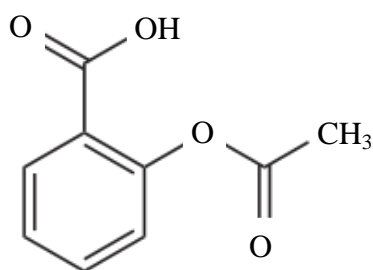
Но-шпа – синтетический аналог папаверина:



Тема 13. Средства, влияющие на центральную нервную систему

Анальгетики – лекарственные вещества природного, полусинтетического и синтетического происхождения, предназначенные для снятия болевых ощущений.

В народной медицине для снятия жара и боли использовали кору ивы. Как позже было установлено, в коре ивы содержится вещество салицин, который при гидролизе превращается в салициловую кислоту, обладающую противовоспалительным и болеутоляющим действием. Ацетилсалициловая кислота была синтезирована еще в 1853 г. и применялась в медицине до 1899 г.:



Среди анальгетиков различают:

1) ненаркотические анальгетики:

- производные салициловой кислоты: ацетилсалициловая кислота, салицилат натрия;
- производные пиразолона: анальгин, бутадиион, амидопирин;
- производные анилина: фенацетин, парацетамол, панадол;
- производные алкановых кислот: бруфен, вольтарен (диклофенак натрия);
- производные антраниловой кислоты: мефенамовая и флуфенамовая кислоты;
- прочие: натрофен, пироксикам, димексид, хлотазол.

2) наркотические анальгетики:

- агонисты опиоидных рецепторов (морфин, промедол, фентанил);
- агонисты-антагонисты и частичные агонисты опиоидных рецепторов (пентазоцин, буторфанол, бупренорфин).

3) по действию:

биохимическому:

– действующие на очаг боли (блокирующие выработку простагландинов);

– блокирующие передачу болевых сигналов в мозг;

наркотическому:

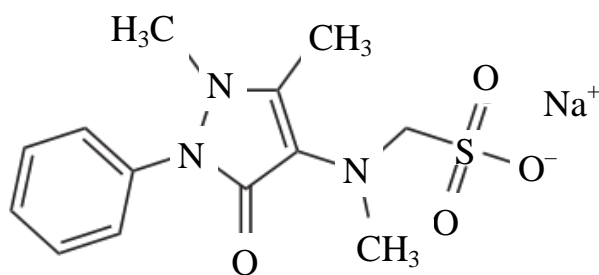
– опиоидные (наркотические) анальгетики – для снятия сильных болей, преимущественно влияют на ЦНС, способны вызывать психическую и физическую зависимость, а также в крупных дозах могут стать причиной смерти от передозировки, поэтому опиоидные анальгетики употребляются в определенном количестве и рационально хранятся под присмотром врачей;

– неопиоидные (ненаркотические) анальгетики – используются для снятия температуры;

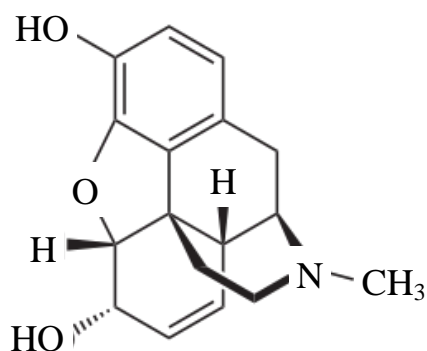
противовоспалительному:

– не угнетающие воспалительные процессы (антипиретики);

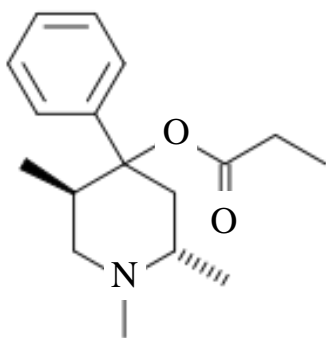
– угнетающие воспалительные процессы (нестероидные противовоспалительные препараты).



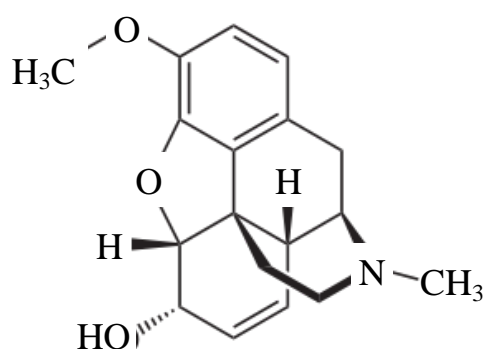
анальгин



морфин



промедол



кодеин

Тема 14. Сульфаниламидные препараты

Сульфаниламиды – противомикробные средства, производные амида сульфаниловой кислоты (белый стрептоцид). Их открытие подтвердило предвидение П. Эрлихом возможности селективного поражения микроорганизмов цитотоксическими веществами резорбтивного действия. Первый препарат этой группы прontosил (красный стрептоцид) предупреждал гибель мышей, зараженных десятикратной летальной дозой гемолитического стрептококка.

На основе молекулы сульфаниламида во второй половине 30-х годов XX века было синтезировано много других соединений (норсульфазол, этазол, сульфазин, сульфацил и др.). Появление антибиотиков снизило интерес к сульфаниламидам, однако клинического значения они не потеряли, в настоящее время широко используются «долгодействующие» (сульфапиридазин, сульфален и др.) и особенно комбинированные препараты (ко-тримоксазол и его аналоги, в состав которых помимо сульфаниламида входит триметоприм). Препараты имеют широкий спектр противомикробного действия (грамположительные и грамотрицательные бактерии, хламидии, некоторые простейшие – возбудители малярии и токсоплазмоза, патогенные грибы – актиномицеты и др.).

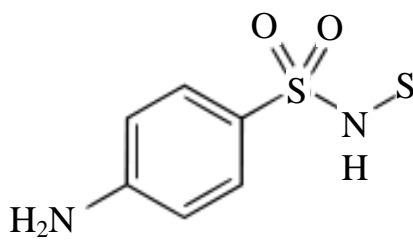
Механизм действия. Сульфаниламиды вызывают бактериостаз. Они являются конкурентными антагонистами парааминобензойной кислоты (ПАБК), необходимой микроорганизмам для синтеза фолиевой кислоты: последняя в коферментной форме (дигидрофолиевой, тетрагидрофолиевой кислот) участвует в образовании пуриновых и пиримидиновых оснований, обеспечивающих рост и развитие микроорганизмов. Сульфаниламиды близки по химическому строению к ПАБК и поэтому захватываются микробной клеткой вместо ПАБК. В результате останавливается синтез фолиевой кислоты. Клетки человека не способны синтезировать фолиевую кислоту (она поступает с пищей), чем и объясняется избирательность антимикробного действия этих препаратов. Сульфаниламиды не влияют на бактерии, сами образующие ПАБК. В присутствии гноя, крови, продуктов разрушения тканей, содержащих большое количество ПАБК, препараты неэффективны. Лекарственные сред-

ства, которые в результате биотрансформации образуют ПАБК (новокаин, дикаин), являются антагонистами сульфаниламидов.

Основной путь введения сульфаниламидов – через рот. В тонком кишечнике они быстро и полно всасываются (кроме утяжеленных препаратов – фтазола, фтазина, салазосульфаниламидов, назначаемых при кишечной инфекции), в крови связываются с белками плазмы, а затем, постепенно освобождаясь из связи, начинают проявлять противомикробное действие, антимикробной активностью обладает только свободная фракция. Почти все сульфаниамиды хорошо проходят тканевые барьеры, в том числе гепатогематический, гематоэнцефалический, плацентарный. В печени биотрансформируются, часть выделяется в желчь (особенно долгодействующие, с успехом поэтому применяемые при инфекциях желчевыводящих путей).

Основной путь биотрансформации сульфаниламидов – ацетилирование. Ацетилированные метаболиты теряют антибактериальную активность, плохо растворимы, в кислой среде мочи могут образовывать кристаллы, которые повреждают или закупоривают почечные каналы. Другой путь биотрансформации – глюкуронидация. Большинство долгодействующих препаратов (сульфадиметоксин, сульфален) теряют активность, связываясь с глюкуроновой кислотой. Образующиеся глюкурониды хорошо растворимы (отсутствует опасность кристаллурии).

Хотя значение сульфаниламидов для клинической практики в последнее время снизилось из-за большого количества устойчивых штаммов, комбинированные препараты по-прежнему широко применяются ввиду их высокой антибактериальной активности, медленно развивающейся устойчивости, низкого процента осложнений. Используются они при мочевых и кишечных инфекциях, заболеваниях дыхательных путей (бронхиты, отиты, синуситы).



общая структура сульфаниламидов

Тема 15. Антибиотики

Группа антибиотиков объединяет химиотерапевтические вещества, образуемые при биосинтезе микроорганизмов, их производные и аналоги, вещества, полученные путем химического синтеза или выделенные из природных источников (ткани животных и растений), обладающие способностью избирательно подавлять в организме возбудителей заболеваний (бактерии, грибы, простейшие, вирусы) или задерживать развитие злокачественных новообразований. Помимо прямого действия на возбудителей заболеваний, многие антибиотики обладают иммуномодулирующим действием. Например, циклоспорин обладает выраженной способностью подавлять иммунитет, что делает его незаменимым при трансплантации органов и тканей и лечении аутоиммунных заболеваний.

Описано более 6000 антибиотиков, из них применение в медицине нашли около 50. Наиболее широко используют беталактамы (пенициллины и цефалоспорины), макролиды (эритромицин, олеандомицин и др.), ансамacroлиды (рифампицин), аминогликозиды (стрептомицин, канамицин, гентамицин, тобрамицин, сизомицин и др.), тетрациклины, полипептиды (бацитрацин, полимиксин и др.), полиены (нистатин, амфотерицин В и др.), стероиды (фузидин), антрациклины (даунорубицин и др.).

Путем химической и микробиологической трансформации созданы так называемые полусинтетические антибиотики, обладающие новыми ценными для медицины свойствами: кислото- и ферментостойчивостью, расширенным спектром антимикробного действия, лучшим распределением в тканях и жидкостях организма, меньшим числом побочных эффектов.

ОСНОВНЫЕ КЛАССИФИКАЦИИ АНТИБИОТИКОВ

По способу получения:

- 1) природные;
- 2) синтетические;
- 3) полусинтетические.

Продуцентами большинства антибиотиков являются:

- 1) актиномицеты;

- 2) плесневые грибы;
- 3) бактерии (полимиксины);
- 4) высшие растения (фитонциды);
- 5) ткани животных и рыб (эритрин, эктерицид).

По направленности действия:

- 1) антибактериальные;
- 2) противогрибковые;
- 3) противоопухолевые.

По спектру действия (числу видов микроорганизмов, на которые действуют антибиотики):

- 1) препараты широкого спектра действия (цефалоспорины 3-го поколения, макролиды);
- 2) препараты узкого спектра действия (циклосерин, линкомицин, бензилпенициллин, клиндамицин).

По химическому строению:

1) *бета-лактамы антибиотики* – основу из молекулы составляет бета-лактамное кольцо. К ним относятся:

а) пенициллины – это группа природных и полусинтетических антибиотиков, молекула которых содержит 6-аминопенициллановую кислоту, состоящую из двух колец – тиазolidинового и бета-лактамного. Среди них выделяют:

- биосинтетические: пенициллин G-бензилпенициллин;
- аминопенициллины: амоксициллин, ампициллин, бенкампициллин;
- полусинтетические «антистафилококковые» пенициллины: оксациллин, метициллин, клоксациллин, диклоксациллин, флуклоксациллин; основное преимущество которых – устойчивость к микробным бета-лактамазам, в первую очередь стафилококковым;

б) цефалоспорины – это природные и полусинтетические антибиотики, полученные на основе 7-аминоцефалоспориновой кислоты и содержащие цефемовое (также бета-лактамное) кольцо, т. е. по структуре они близки к пенициллинам. Делятся на цефалоспорины:

- 1-го поколения: цепорин, цефалотин, цефалексин;
- 2-го поколения: цефазолин (кефзол), цефамезин, цефамандол (мандол);
- 3-го поколения: цефуроксим (кетоцеф), цефотаксим (клафоран), цефуроксим аксетил (зиннат), цефтриаксон (лонгацеф), цефтазидим (фортум);

– 4-го поколения: цефепим, цефпиром (цефром, кейтен) и др.;

в) монобактамы – азтреонам (азактам, небактам);

г) карбопенемы – меропенем (меронем) и имипинем;

2) *аминогликозиды*. Они содержат аминосахара, соединенные гликозидной связью с остальной частью (агликоновым фрагментом) молекулы. К ним относятся: стрептомицин, гентамицин (гарамицин), канамицин, неомицин, мономицин, сизомицин, тобрамицин (тобра) и полусинтетические аминогликозиды – спектиномицин, амикацин (амикин), нетилмицин (нетиллин);

3) *тетрациклины*. Основу молекулы составляет полифункциональное гидронафтаценовое соединение с родовым названием тетрациклин. Среди них имеются природные тетрациклины – тетрациклин, окситетрациклин (клинимицин) и полусинтетические тетрациклины – метациклин, хлортетрин, доксициклин (вибрамицин), миноциклин, ролитетрациклин;

4) *макролиды*. Препараты этой группы содержат в своей молекуле макроциклическое лактоновое кольцо, связанное с одним или несколькими углеводными остатками. К ним относятся: эритромицин, олеандомицин, рокситромицин (рулид), азитромицин (сумамед), кларитромицин (клацид), спирамицин, диритромицин;

5) *линкозамиды*. К ним относятся: линкомицин и клиндамицин. Фармакологические и биологические свойства этих антибиотиков очень близки к макролидам, и, хотя в химическом отношении это совершенно иные препараты, некоторые медицинские источники и фармацевтические фирмы – производители химиопрепаратов, например делацина С, – относят линкозамиды к группе макролидов;

6) *гликопептиды*. Препараты этой группы в своей молекуле содержат замещенные пептидные соединения. К ним относятся: ванкомицин (ванкацин, диатрацин), тейкопланин (таргоцид), даптомицин;

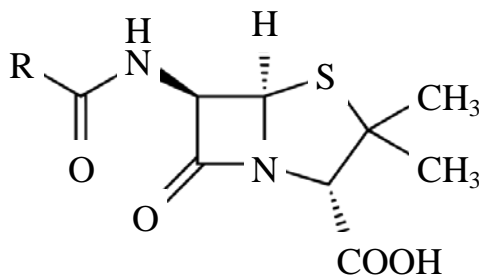
7) *полипептиды*. Препараты этой группы в своей молекуле содержат остатки полипептидных соединений, к ним относятся: грамицидин, полимиксины М и В, бацитрацин, колистин;

8) *полиены*. Препараты этой группы в своей молекуле содержат несколько сопряженных двойных связей. К ним относятся: амфотерицин В, нистатин, леворин, натамицин;

9) *антрациклиновые антибиотики*. К ним относятся противоопухолевые антибиотики: доксорубицин, карминомицин, рубомицин, акларубицин.

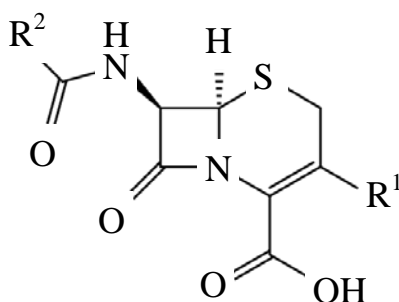
Есть еще несколько достаточно широко используемых в настоящее время в практике антибиотиков, не относящихся ни к одной из перечисленных групп – фосфомицин, фузидиевая кислота (фузидин), рифампицин. В основе антимикробного действия антибиотиков, как и других химиотерапевтических средств, лежит нарушение метаболизма микробных клеток.

Пенициллины. Обладают широким спектром антибактериального действия, проявляя как бактериостатическую, так и бактерицидную активность в отношении многих грамположительных микроорганизмов (стафилококков, пневмококков, стрептококков), некоторых грамотрицательных кокков (гонококков, менингококков), палочек сибирской язвы, клостридий, спирохет и некоторых грибов. Широкое медицинское применение пенициллинов связано с их относительно низкой токсичностью для теплокровных, хотя в ряде случаев эти антибиотики вызывают аллергические заболевания и анафилактический шок. Молекула пенициллина содержит β -лактам-тиазолидиновую бициклическую систему пенама и имеет строго необходимую для проявления биологической активности конфигурацию.



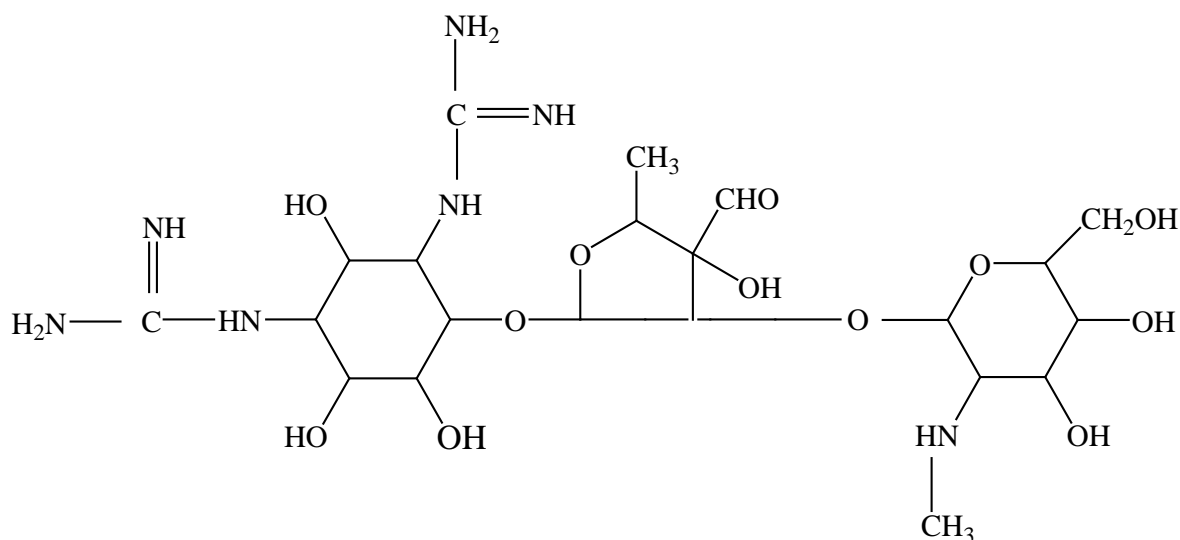
общая структурная формула пенициллинов

Цефалоспорины. Оказывают бактерицидное действие. Имеют широкий спектр антимикробной активности, хорошие фармакокинетические характеристики, низкую токсичность и хорошую переносимость (в том числе при использовании в максимальных дозах). Выделяют четыре поколения цефалоспоринов. В ряду от I к IV поколению расширяется спектр действия и повышается уровень антимикробной активности в отношении грамотрицательных бактерий и пневмококков, немного снижается активность в отношении стафилококков от I к III поколению. Механизм действия β -лактамных антибиотиков состоит в подавлении синтеза бактериальной клеточной стенки.



общая формула цефалоспоринов

Аминогликозиды. По широте клинического применения группа антибиотиков аминогликозидов занимает четвертое место после β -лактамов, тетрациклинов и неполиеновых макролидов. Стрептомицин, обнаруженный в результате тщательно спланированной программы поиска препаратов, активных против грамотрицательных бактерий, оказался первым эффективным антибиотиком для лечения туберкулеза; наряду с другими аминогликозидами он используется также для борьбы с заболеваниями, вызываемыми различными видами *Pseudomonas* и *Proteus*, а иногда также *Streptomyces* и *Staphylococcus*.

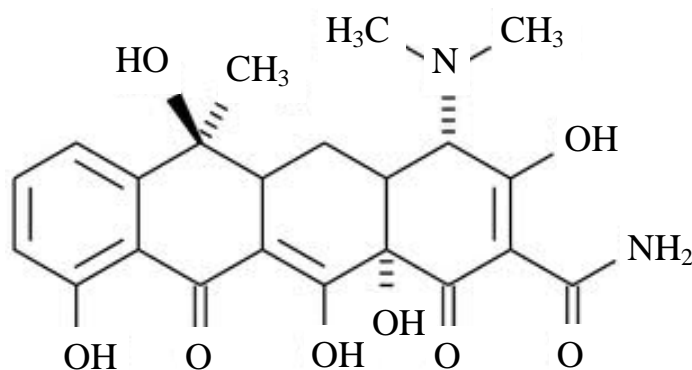


стрептомицин

Аминогликозиды – многочисленное семейство антибиотиков, охватывающее более 100 природных соединений, продуцируемых микроорганизмами родов *Streptomyces*, *Micromonospora* и *Bacillus*, а также большое число полусинтетических аналогов. Их объединяет наличие в молекуле одного из шестичленных карбо-

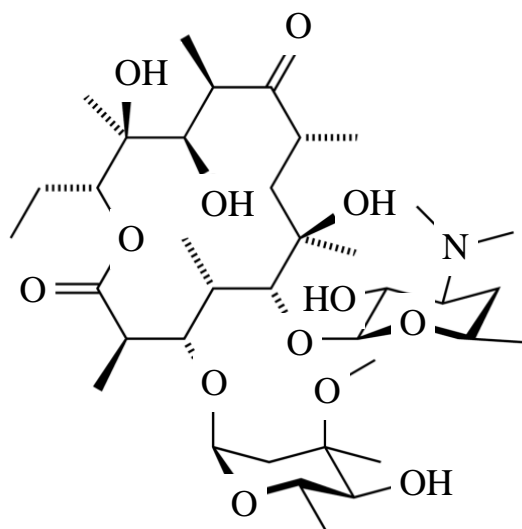
циклических аминспиртов (аминоинозитов), гликозилированных одним или несколькими обычными или специфическими аминами.

Тетрациклины. Занимают второе место после β -лактамов по широте клинического применения. Они высокоактивны против грамположительных и большинства грамотрицательных бактерий, риккетсий и микоплазм и применяются для борьбы с пневмонией, дизентерией, коклюшем, гонореей, бруцеллезом, туляремией, сыпным и возвратным тифом, холециститом, менингитом и другими инфекционными заболеваниями, а также гнойными осложнениями в хирургии. Первый тетрациклиновый антибиотик хлортетрациклин (ауреомицин) выделен Б. Даггером в 1948 г. из *Streptomyces aureofaciens*, в 1950 г. описан окситетрациклин (террамицин) из *S. rimosus*, а позднее получен (как каталитическим восстановлением хлортетрациклина, так и биосинтезом) тетрациклин и остальные шесть природных тетрациклинов.



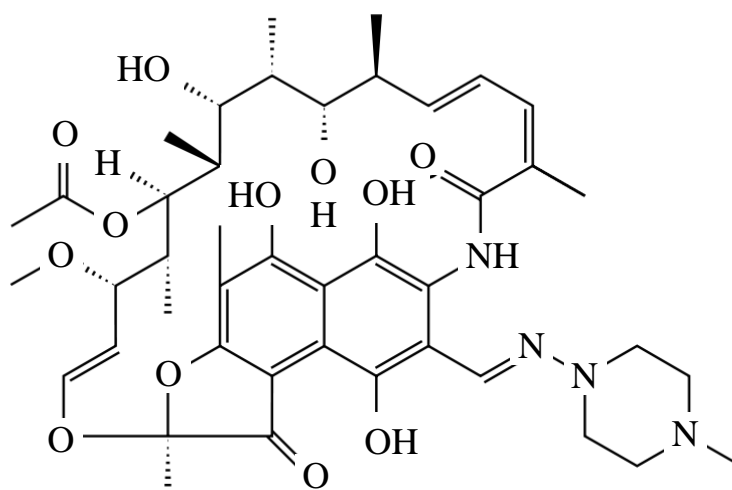
тетрациклин

Макролиды. Представляют собой класс антибиотиков, основу химической структуры которых составляет макроциклическое лактонное кольцо. В зависимости от числа атомов углерода в кольце макролиды подразделяются на 14-членные (эритромицин, рокситромицин, кларитромицин), 15-членные (азитромицин) и 16-членные (мидекамицин, спирамицин, джозамицин). Основное клиническое значение имеет активность макролидов в отношении грамположительных кокков и внутриклеточных возбудителей (микоплазмы, хламидии, кампилобактеры, легионеллы). Макролиды относятся к числу наименее токсичных антибиотиков. Химическая структура молекулы эритромицина:



Антимикробное действие макролидов обусловлено нарушением синтеза белка на этапе трансляции в клетках чувствительных микроорганизмов. Антибактериальные макролиды обладают бактериостатическим действием, хотя при больших концентрациях могут вызывать гибель чувствительных клеток.

Среди макролидов можно выделить важную подгруппу антибиотиков, называемых *ансамacroлидами*. Их биологическая активность связана с подавлением биосинтеза нуклеиновых кислот. Характерной чертой химического строения ансамacroлидов является наличие алифатической лактамной цепи, которая, как ручка корзины (от лат. *ansa* – ручка), связывает два несмежных положения нафталинового или бензольного кольца. Наиболее важные представители первой нафталиновой группы – рифамицины В и SV, а также полусинтетический рифампицин. Рифампицин – наиболее эффективный антибиотик для лечения туберкулеза.



рифампицин

Механизм действия ансамacroлидов уникален. Они подавляют активность ДНК-зависимых РНК-полимераз из клеток бактерий и совершенно не взаимодействуют с РНК-полимеразами млекопитающих. Конкретная мишень нафталиновых ансамacroлидов – β -субъединицы фермента, с которыми они образуют очень прочные нековалентные комплексы, из-за чего нарушается образование второй и третьей фосфодиэфирных связей в РНК.

Антифунгальные антибиотики. Среди них наиболее важную группу составляют полиеновые макролиды. В настоящее время широко распространенными являются четыре антибиотика этой группы: амфотерицин В, нистатин, леворин и трихомицин; в мире употребляются в основном первые два из них и кандицидин, главный компонент которого идентичен леворину А2. Для полиеновых макролидов характерно наличие в молекуле сопряженной системы двойных связей, по количеству которых их классифицируют как три-, тетра-, пента-, гекса- или гептаены. Широко применяемые макролидные антибиотики обладают цвиттер-ионным характером и поэтому плохо растворимы в воде. Нистатин и леворин применяются только местно и плохо всасываются при оральном применении. Внутривенно, для лечения системных микозов, применяют только амфотерицин В. Для улучшения растворимости полиеновых антибиотиков предложено использовать их *N*-ацетильные и некоторые другие производные, например *n*-бутиламиды, четвертичные соли и *N*-диметиламинометиленовые производные метиловых эфиров. В отличие от всех рассмотренных выше антибиотиков мишенью действия полиеновых макролидов является не конкретная макромолекула, а важнейшая часть клетки в целом – ее мембрана.

Антрациклины. Важнейшая группа антибиотиков, используемых в химиотерапии злокачественных опухолей. Они активны также в отношении грамположительных бактерий, грибов и вирусов, но обладают слишком большой токсичностью, в особенности кумулятивной кардиотоксичностью, которая исключает их применение в химиотерапии инфекционных заболеваний. Антрациклины представляют собой сочлененные с карбоциклическим кольцом антрахиноны, несущие различное количество заместителей и гидроксильных групп, одна из которых гликозилирована специфическим моносахаридом или трисахаридом.

Наиболее широкое применение в клинической практике находят три антрациклина (табл. 3): дауномицин, адриамицин (доксорубицин) и карминомицин. Большая часть антрациклинов продуцируется

различными видами *Streptomyces* и была открыта в 1956–1964 гг. В основе строения всех указанных антибиотиков – антрахиноновая структура.

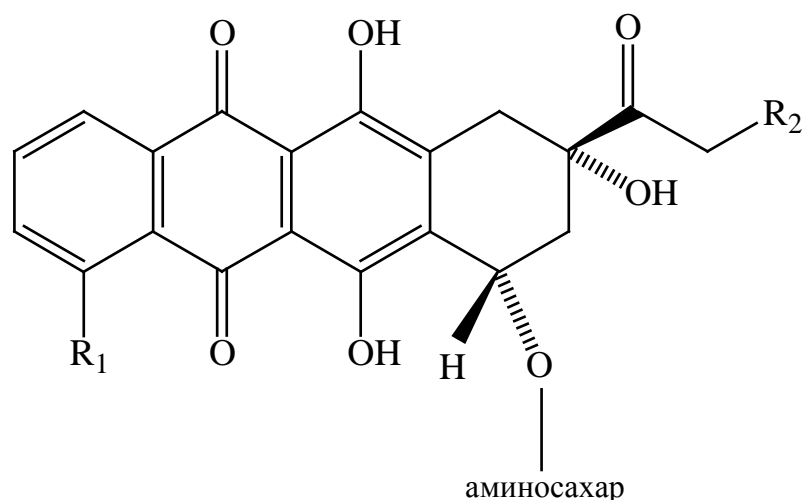


Таблица 3

Общая структура антрациклиновых антибиотиков

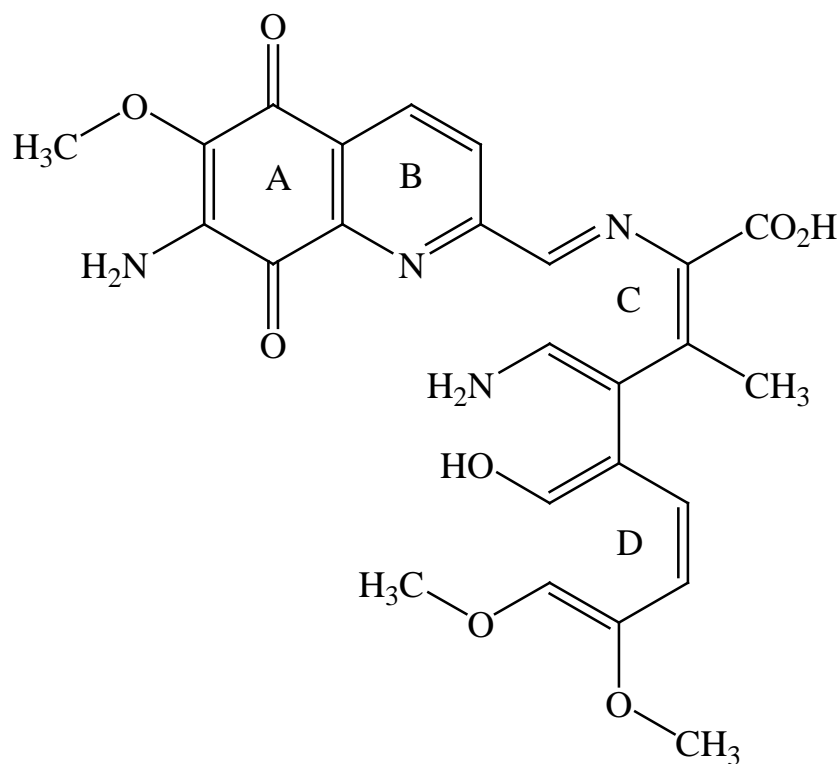
Антрациклин	R ₁	R ₂
Дауномицин	–OCH ₃	–H
Адриамицин	–OCH ₃	–OH
Карминомицин	–H	–H

По механизму действия антрациклины близки актиномицину D: подавляют ДНК-зависимый синтез РНК (ее элонгацию) и гораздо слабее влияют на репликацию. В литературе имеются сведения, что некоторые аналоги дауномицина проявляют высокую противоопухолевую активность, ингибируют синтез РНК, не образуя комплексов с ДНК.

Среди противоопухолевых антибиотиков можно также отметить **стрептонигрин**. Этот антибиотик широкого спектра действия из *Streptomyces flocculus* описан в 1959–1960 гг. К. Рао и В. Кулленом, а затем выделен и введен в онкологическую практику под названием брунеомицин, или рубихромомицин.

Строение антибиотика установлено в 1963 г. К. Рао, К. Биманом и Р. Б. Вудвордом. Антибиотик вызывает одиночные разрывы в ДНК. Он связывается с ней как в хинолинхинонной, так и в восстановленной формах, образуя два типа комплексов, диализуемых и недиализуемых, причем последние содержат одну молекулу антибиотика на 2000 п. о. Механизм его действия, вероятно, состоит в

том, что он восстанавливается НАДН до гидрохинона и далее окисляется в семихинон кислородом воздуха с одновременным образованием супероксидных радикалов (O-O^\bullet), которые и вызывают гибель клеток.

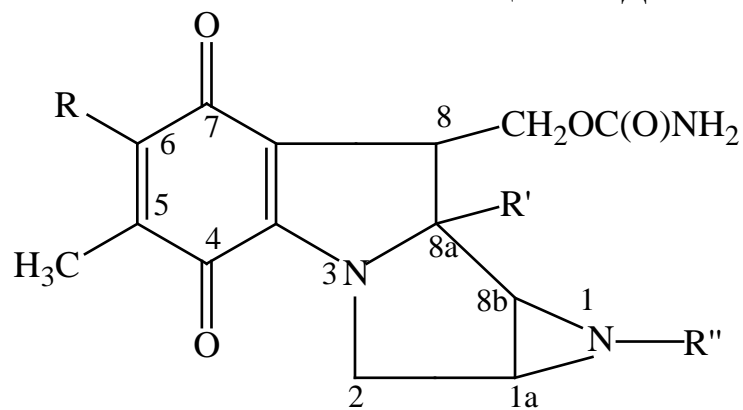


стрептонигин

Митомицины А, В и С, а также порфирамицин представляют собой комплекс противоопухолевых антибиотиков, продуцируемых несколькими видами *Streptomyces*. Впервые они обнаружены японскими исследователями в 1956 г., а их строение определено химическим и рентгеноструктурным анализом в 1962–1976 гг. Описаны полные синтезы митомицинов и множества их производных и аналогов. Из них ряд соединений проявляет большую активность против отдельных видов опухолей (лейкопения) и меньшую токсичность. Отличительной чертой химического строения митомицинов является присутствие в молекулах азиридинового цикла, редко встречающегося среди природных соединений.

Отличительной чертой химического строения митомицинов является присутствие в молекулах азиридинового цикла, редко встречающегося среди природных соединений. **Митомицины** – быстродействующие бактерицидные и цитотоксичные реагенты, и устойчивость к ним клеток некоторых бактерий может быть

объяснена только барьерами проницаемости. Мишенью действия митомицинов является ДНК – они быстро подавляют репликацию и вызывают разрушение существующей ДНК двумя путями: во-первых, образованием модифицированных пуриновых звеньев (одно звено на 200–300 пар оснований) и, во-вторых, бифункциональным связыванием двух комплементарных цепей ДНК. Интересно, что вирусная ДНК, в отличие от ДНК клеток хозяина, митомицинами почти не разрушается. Обязательным условием действия митомицинов является их предварительное восстановление с помощью НАДН *in vivo*.



МИТОМИЦИН

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Химия биологически активных природных соединений: в 2 ч. / под ред. Н. А. Преображенного. – М.: Мир, 1970, 1976. – Ч. 1. – 512 с.; Ч. 2. – 456 с.
2. Овчинников, Ю. А. Биоорганическая химия / Ю. А. Овчинников. – М.: Просвещение, 1987. – 815 с.
3. Тюкавкина, Н. А. Биоорганическая химия / Н. А. Тюкавкина. – М.: Дрофа, 2005. – 542 с.
4. Сорочинская, Е. И. Биоорганическая химия / Е. И. Сорочинская. – СПб.: изд-во С.-Петербургского ун-та, 2008. – 148 с.
5. Мецлер, Д. Биохимия: в 3 т. / Д. Мецлер. – М.: Мир, 1980. – Т. 1. – 407 с.; Т. 2. – 606 с.; Т. 3. – 488 с.
6. Ленинджер, А. Основы биохимии: в 3 т. / А. Ленинджер. – М.: Мир, 1985. – Т. 1. – 365 с.; Т. 2. – 355 с.; Т. 3. – 313 с.
7. Руководство к лабораторным занятиям по биоорганической химии (задачи, тесты) / под ред. Н. А. Тюкавкиной. – М.: Мир, 1999. – 167 с.
8. Леонтьев, В. Н. Биохимия. Лабораторный практикум / В. Н. Леонтьев, Т. И. Ахрамович. – Минск: БГТУ, 2008. – 218 с.
9. Машковский, М. Д. Лекарственные средства / М. Д. Машковский. – М.: Новая волна, 2007. – 1206 с.

Учебное издание

Леонтьев Виктор Николаевич
Игнатовец Ольга Степановна

ХИМИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Электронный курс лекций

Редактор *Ю. А. Ирхина*
Компьютерная верстка *Е. Ю. Новикова, Я. Ч. Болбот*
Корректор *Ю. А. Ирхина*

Издатель:
УО «Белорусский государственный технологический университет».
ЛИ № 02330/0549423 от 08.04.2009
Ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск